



U

F

R

N

LUCIANA ELOÍSA DA SILVA CASTRO NÓBREGA

**ESTUDO DA IMUNOEXPRESSÃO DO VEGF165 E DO
VEGF165b EM LESÕES ORAIS DE LÍQUEN PLANO E
PÊNFIGO VULGAR**

Natal/RN

2018

LUCIANA ELOÍSA DA SILVA CASTRO NÓBREGA

**ESTUDO DA IMUNOEXPRESSÃO DO VEGF165 E DO VEGF165b EM LESÕES
ORAIS DE LÍQUEN PLANO E PÊNFIGO VULGAR**

NATAL/RN

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL

**ESTUDO DA IMUNOEXPRESSÃO DO VEGF165 E DO VEGF165b EM LESÕES
ORAIS DE LÍQUEN PLANO E PÊNFIGO VULGAR**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Patologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Lisboa Lopes Costa

Natal/RN

2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Alberto Moreira Campos - -Departamento de Odontologia

Castro, Luciana Eloisa da Silva.

Estudo da imunoexpressão do VEGF165 e do VEGF165B em lesões orais de líquen plano e pênfigo vulgar / Luciana Eloisa da Silva Castro. - 2018.

96f.: il.

Tese (Doutorado em Patologia Oral) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Patologia Oral, Natal, 2018.

Orientador: Dr. Antônio de Lisboa Lopes Costa.

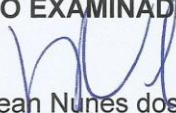
1. Líquen Plano Oral - Tese. 2. Pênfigo - Tese. 3. Neovascularização Patológica - Tese. I. Costa, Antônio de Lisboa Lopes. II. Título.

RN/UF/BSO

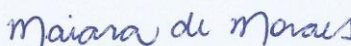
BLACK D61

A defesa deste trabalho foi realizada no dia 28 de junho de 2018, em Natal/RN, obteve o conceito "aprovado".

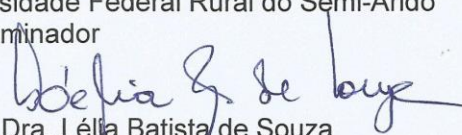
COMISSÃO EXAMINADORA



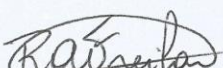
Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos
Universidade Federal da Bahia
1º Examinador




Profa. Dra. Maiara de Moraes
Universidade Federal Rural do Semi-Árido
2º Examinador



Profa. Dra. Léila Batista de Souza
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
3º Examinador



Profa. Dra. Roseana de Almeida Freitas
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
4º Examinador



Prof. Dr. Antonio de Lisboa Lopes Costa
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Presidente - Orientador

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

A **DEUS**, que sempre me conforta em oração nos momentos mais angustiantes e me abençoa todos os dias.

“Não cai uma lágrima de nossos olhos, não tem um suspiro em nossos corações sem uma resposta de DEUS”. (Bv. João XXIII)

Aos meus queridos pais, irmãos e sobrinha por todo amor, dedicação e por nunca deixarem de acreditar em mim até nos momentos que nem eu mesma acredito. Amo vocês!

Ao meu marido, **José Newton Filho**, por me tornar uma mulher plena, realizada e sempre me apoiar em qualquer circunstância. Eu amo você para sempre!

Aos meus cachorros, os quais todos os dias me mostram que o maior sentido da vida é
AMAR!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor, **Antônio de Lisboa Lopes Costa**, meu orientador, por sempre se mostrar interessado nas minhas dúvidas e incertezas, dando-me segurança e orientando-me no intuito de mostrar o melhor caminho nessa batalha. Exemplo de amor e dedicação não só para a Patologia Oral, mas para toda a Odontologia, abraçando toda causa em prol do pleno funcionamento da Faculdade de Odontologia da UFRN, tornando essa uma das melhores faculdades da área do Brasil. Esse, sim, sábio Mestre! Eu sou só orgulho e admiração!

A **toda a minha família**, que torce e vibra com cada conquista minha desde os meus primeiros passos.

Aos **meus queridos amigos**, que sentiram minha falta nos momentos que tive que me ausentar, porém sempre entenderam que isso era preciso, torcendo com afincos para a minha felicidade e realização.

À coordenadora, **Dr^a. Lélia Maria Guedes Queiroz**, por toda a sua dedicação, conhecimentos a mim transmitidos e por coordenar tão brilhantemente o Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da UFRN.

Ser mestre não é apenas lecionar, ensinar não é apenas transmitir o conteúdo programático. Ser mestre é ser orientador, guia e companheiro, é caminhar com o aluno passo a passo. É transmitir a este os segredos da caminhada. Ser mestre é ser exemplo de dedicação, de doação, de dignidade pessoal e de amor. Eu posso afirmar, com muito orgulho, que durante todos esses anos de pós-graduação eu tive e tenho mestres assim, todos bastante preocupados em nos transmitir o máximo de conhecimento possível, com a melhor qualidade, sem demonstrar desânimo, entendendo os limites de cada um. E é por isso, meus mestres, **Prof^a. Dr^a. Roseana de Almeida Freitas, Prof^a. Dr^a. Hébel Cavalcanti Galvão, Prof^a. Dra. Lélia Batista de Souza, Prof^a. Dr^a. Lélia Maria Guedes Queiroz, Prof. Dr. Leão Pereira Pinto, Prof^a. Dr^a. Éricka Janine Dantas da Silveira, Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina da Costa Miguel, Prof^a. Dr^a. Ana Miryam Costa de Medeiros, e Prof^a. Dr^a. Patrícia Teixeira**, que devo todo o conhecimento adquirido no Mestrado e agora no Doutorado da Patologia Oral a vocês. O meu muito obrigada, hoje e sempre!

A todos os meus colegas do Programa da Pós-Graduação em Patologia Oral da UFRN, principalmente **Roseane Vasconcelos**, que desde o princípio deu-me forças não me deixando desistir em nenhum momento. Seu carinho, espontaneidade e amizade me foram essenciais nessa trajetória. **Hugo Costa**, sempre tão doce e acolhedor em todos os momentos. **Thâmara Manoela**, que mesmo de longe sempre acreditou e torceu por mim. **Héllen Bandeira**, pessoa que eu tenho uma admiração enorme por ela ser fonte de tanta sabedoria e força.

Aos meus queridos colegas de turma, **Tiago João, Maria Luiza, Andréia, Marcelo, Viviane, Laudenice e Laura** que foram tão importantes nessa difícil e enriquecedora jornada que é a pós-graduação, tornando tudo mais agradável para mim...Sem vocês não teria graça alguma!

Aos demais colegas e amigos que conviveram comigo no programa de pós-graduação, alguns dos quais hoje já professores, **Adriana Câmara, Ana Luiza Andrade, Angélica Mandú, Barbara Monteiro, Caio Barros, Clarissa Damedá, Cristiane Medeiros, Dáurea Sena, Deborah Moreira, Eduardo Cruz, Emeline Lima, Everton Freitas, Fernanda Ginani, Glória França, Hianne Medeiros, Israel Leal, Jadson Lima, Jamile Marinho, Jefferson Tenório, Joabe Pereira, Juliana Pinheiro, Keila Barroso, Larissa Rolim, Leorik Pereira, Luiz Arthur, Mara Luana, Mariana Serpa, Mariana Xerez, Natália Guimarães, José Nazareno, Ondina Rocha, Patrícia Peixe, Rafaella, Rodrigo Mafra, Rômulo Macêdo, Salomão Israel, Stefânia Ferreira, Thaís Maciel, Thalita Santana e Yalit Vragas**, obrigada por todos os momentos de aprendizado compartilhados, auxílio nas angústias e risadas calorosas.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da UFRN, **Gracinha, Lourdinha, Idelzuite, Sandrinha, Ricardo, Francine e Hévio** pela paciência e disponibilidade em ajudar.

À **Pro-Reitoria de Pós-Graduação da UFRN** e à **Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Norte (FAPERN)** pelos auxílios financeiros disponibilizados durante o doutorado.

“Talvez eu seja um pouco de tudo que já li. Um pouco de tudo que meu olhar já aprendeu do mundo. Um pouco das belas músicas. Um pouco daqueles que me são queridos. Um pouco de múltiplos sentimentos e algumas fraquezas. Talvez eu seja um pouco do que você deixou em mim, mas em essência, o muito da minha essência, é algo delicado e misterioso...”

Rubem Alves

“Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

RESUMO

O Líquen Plano Oral (LPO) é uma doença mucocutânea mediada imunologicamente, de etiologia desconhecida, relativamente comum, com prevalências, na população mundial, que variam de 0,22 a 5%. O pênfigo vulgar é uma doença autoimune crônica que pode acometer a mucosa oral sendo o mais comum dos tipos de pênfigo. Entretanto, sua ocorrência é rara, com incidência estimada na população geral de um a cinco casos por milhão de pessoas diagnosticadas a cada ano. O VEGF-A é a proteína angiogênica mais potente tanto na angiogênese normal quanto na patológica. O *splicing* alternativo do éxon 8 do gene do VEGFA dá origem a duas famílias conhecidas de proteínas isofórmicas, uma desempenhando papel angiogênico, VEGF_{xxx}a, e outra um papel antiangiogênico, VEGF_{xxx}b. Este trabalho se propôs a avaliar a expressão imunoistoquímica do VEGF165 (angiogênico), do VEGF165b (antiangiogênico) em 46 casos de LPO reticular, 23 casos de LPO erosivo e 12 casos de PV, usando como controle 11 casos de hiperplasia fibrosa. Todos os espécimes das lesões e os casos controle foram divididos em e zonas para a análise das marcações, em zona superficial (Z1), média (Z2) e profunda (Z3). Os resultados deste experimento foram submetidos a testes estatístico não-paramétricos com nível de significância de 5%. Comparando apenas as lesões para o marcador anti-VEGF165 foram observadas diferenças significativas apenas nas zonas mais profundas entre as lesões de LPO reticular e PV, e entre as lesões de LPO erosivo e PV. Para o marcador anti-VEGF165b diferenças significativas foram observadas nas zonas médias entre as lesões de LPO reticular e PV; e nas zonas profundas entre LPO erosivo e PV e entre LPO reticular e PV. Avaliando o marcador VEGF165b nos espécimes sem categorizá-los por zonas foram observadas diferenças significativas entre as lesões de LPO reticular e PV. Na análise da correlação entre ambos os marcadores em cada lesão foram observadas correlação positiva fraca e significativa nas zonas média e profunda do LPO reticular e na zona superficial do LPO erosivo. Os resultados do presente estudo sugerem a participação do processo angiogênico na patogênese do LPO e na progressão das lesões de líquen plano oral e pênfigo vulgar, porém outros estudos devem ser realizados a fim de que esses achados, principalmente em relação ao pênfigo vulgar seja fundamentado, uma vez que a presente pesquisa é uma das primeiras que avalia a angiogênese na lesão já estabelecida dessa doença.

Palavras-chaves: Líquen Plano Oral; Pênfigo; Neovascularização Patológica; Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

ABSTRACT

Oral Lichen Planus is an immunologically mediated mucocutaneous disease of relatively unknown etiology with prevalences in the world population varying from 0.22 to 5%. Pemphigus vulgaris is a chronic autoimmune disease that may affect the oral mucosa being the most common type of pemphigus. However, its occurrence is rare, with an estimated incidence in the general population of one to five cases per million people diagnosed each year. Angiogenesis plays an important role in tumor growth and in the progression of chronic inflammatory diseases. VEGF-A is the most potent angiogenic protein in both normal and pathological angiogenesis. The alternative splicing of exon 8 VEGF-A gene gives rise to two known families of isoform proteins, one playing angiogenic role, VEGF_{xxx}a, and another an antiangiogenic role, VEGF_{xxx}b. The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of VEGF165 (angiogenic), VEGF165b (antiangiogenic) in 46 cases of reticular OLP, 23 cases of erosive OLP and 12 cases of PV, using as control 11 cases of fibrous hyperplasia. All specimens of the lesions and the control cases were divided into zones for the analysis of the immunohistochemical stains, in superficial (Z1), medium (Z2) and deep zones (Z3). The results of this experiment were submitted to non-parametric statistical tests with significance level of 5%. For all immunohistochemical stains the comparison between the lesions with the control group (HF) showed significant differences. Comparing only the lesions to the anti-VEGF165 stains, significant differences were observed only in the deeper zones between the reticular LPO lesions X PV; and between erosive LPO lesions X PV. For the anti-VEGF165b stains, significant differences were observed in medium zones between reticular OLP X PV lesions; and in deep zones between erosive LPO X PV and between reticular LPO and PV. And evaluating VEGF165b stains in specimens without categorizing them by zones was observed a significant difference between reticular LPO and PV lesions. In the analysis of the correlation between both markers in each lesion, a weak and significant positive correlation was observed in medium and deep zones of reticular OLP; and a weak positive correlation in superficial zone of erosive LPO. The present study results suggest angiogenic process participation in the pathogenesis and progression of lesions of oral lichen planus and pemphigus vulgaris. However other studies must be carried out in order that this implication, mainly in relation to pemphigus vulgaris be based once this is one of the first studies to evaluate angiogenesis in the already established lesion of this disease.

Keywords: Oral Lichen Planus; Pemphigus; Pathological Neovascularization; Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura exônica teórica do pré-mRNA do VEGF	30
Figura 2	Estrutura do gene VEGF-A e splicing alternativo do VEGF-A geram isoformas VEGF _{xxx} e VEGF _{xxx} b.....	31
Figura 3	Fotomicrografia de líquen plano oral (LPO) indicando as regiões definidas como Zonas 1, 2 e 3 nas referidas colunas.	42
Figura 4	Fotomicrografias LPO Reticular. A e C) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165. B e D) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165b (LSAB, 100X).....	50
Figura 5	Fotomicrografia LPO Erosivo. A e C) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165. B e D) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165b (LSAB, 100X).....	50
Figura 6	Fotomicrografia Pênfigo Vulgar. A e C) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165. B e D) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165b (LSAB, 100X)	51
Figura 7	Fotomicrografia Hiperplasia Fibrosa. A e C) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165. B e D) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165b (LSAB, 200X)	51

LISTA DE QUADROS E TABELAS

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Especificação, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos utilizados	42
Tabela 1	Sexo, cor e localização segundo a lesão apresentada.....	45
Tabela 2	Avaliação das médias de marcação dos anticorpos VEGF165 e VEGF165b por zonas e nos espécimes das lesões orais de LP e PV em sua totalidade	48
Tabela 3	Intensidade de marcação dos anticorpos VEGF165 e VEGF165b nas lesões orais de LP e PV	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

- **LP** Líquen Plano
- **LPO** Líquen Plano Oral
- **RL** Reação Liquenóide
- **PV** Pênfigo Vulgar
- **HF** Hiperplasia Fibrosa
- **VEGF** Fator de Crescimento Endotelial Vascular
- **HIF-1 α** Fator Induzível por Hipóxia – 1 alfa
- **SNP** Polimorfismo de Nucleotídeo Único
- **MHC** Complexo Principal de Histocompatibilidade
- **CD** *Cluster of Differentiation* – Unidade de Diferenciação
- **Th** *T Helper* – Células T Auxiliares
- **IL** Interleucina
- **INF- γ** Interferon gama
- **TNF- α** *Tumor Necrosis Factor alfa* – Fator de Necrose Tumoral alfa
- **APC** *Antigen-Presenting Cell* – Célula Apresentadora de Antígeno
- **NK** *Natural Killers*
- **MMP** *Matrix Metalloproteinases* – Metaloproteinases da Matriz
- **IFD** Imunofluorescência Direta
- **OMS** Organização Mundial da Saúde
- **HPV** *Human Papilloma Virus* - Papiloma Vírus Humano
- **MDM2** *Murine Doble Minute 2*
- **SUMO-1** *Small Ubiquitin-Like Modifier*
- **PCNA** *Proliferative Nuclear Cell Antigen* – Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
- **AgNOR** *Argyrophilic Nuclear Organizer Region* – Região Organizadora Nuclear Argirofílica
- **Bcl2** *B-cell Lymphoma 2*
- **BAX** *BCL-2 associated protein X* – Proteína X associada à BCL-2
- **8-oxodG** 8-di-hidro-2-etoxiguanosina
- **IgG** Imunoglobulina G

• HLA	Antígeno Leucocitário Humano
• IgM	Imunoglobulina M
• 6p21.3	Braço curto do Cromossomo 6, Região 21.3
• PSS	Seleção do Espaço Proximal
• DSS	Seleção do Espaço Distal
• Pb	Pares de Base
• NRP	Neuropilina
• VEGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
• FGF	Fator de Crescimento dos Fibroblastos
• PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
• RT-PCR	<i>Real Time</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
• KDa	Kilodalton
• ODD	Centrais de Degradação Dependentes de Oxigênio
• TAD's	Domínios Transativacionais
• HRE	Elementos Responsivos à Hipóxia
• iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
• HOX-1	<i>Heme Oxygenase 1</i>
• PGK-1	<i>Phosphoglycerate Kinase 1</i>
• LDH-1	Lactato Desidrogenase-1
• GLUT-1	<i>Glucose Transporter 1</i>
• COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
• NO	Óxido Nitroso
• EGF	Fator de Crescimento Epidermal
• PI3K/AKT	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase/ Threonine Kinase</i>
• MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
• DNA	Ácido Desoxirribonucléico
• H/E	Hematoxilina/Eosina
• mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> – Ácido Ribonucleico Mensageiro
• Dsg	Desmogleína
• Dsc3	Desmocolina 3
• FasR	Receptor Fas
• ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>

- **C3** Complemento 3
- **VCAM-1** *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* – Molécula de Adesão Celulas Vascular 1
- **ICAM-1** *Intercellular Adhesion Molecule 1* – Molécula de Adesão Intercelular 1.
- **ImageJ** *Image Processing and Analysis in Java*
- **SPSS** *Statistical Package for the Social Sciences*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 LÍQUEN PLANO ORAL	16
2.1.1 Considerações Gerais, Aspectos Clínicos e Histopatologia.....	16
2.2 PÊNFIGO VULGAR	20
2.2.1 Considerações Gerais, Aspectos Clínicos e Histopatologia.....	20
2.3 ANGIOGÊNESE.....	26
2.3.1 Considerações Gerais	26
2.3.2 Angiogênese nas Lesões de Líquen Plano Oral e Pênfigo Vulgar.	27
2.4 VEGF165 (ANGIOGÊNICO) E VEGF165b (ANTI-ANGIOGÊNICO).....	30
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	37
4.3 POPULAÇÃO	37
4.4 AMOSTRA	37
4.4.1 Critérios para Seleção da Amostra	38
4.5 ESTUDO CLÍNICO E MORFOLÓGICO	38
4.6 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO	39
4.6.1 Análise do Perfil Imunoistoquímico	40
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5 RESULTADOS.....	45
5.1 RESULTADOS CLÍNICOS	45
5.2 RESULTADOS MORFOLÓGICOS	46
5.3 RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICOS	46
6 DISCUSSÃO	53
7 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	61
8 REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE.....	74
ANEXO	76

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Líquen Plano Oral e o Pênfigo Vulgar são doenças crônicas mucocutâneas de etiologias desconhecidas que se manifestam na forma de lesões intraorais, mas que também podem acometer outras regiões da pele e mucosas (EBRAHIMI *et al.*, 2011; PATEL *et al.*, 2016). A angiogênese vem sendo bastante estudada em lesões autoimunes inflamatórias uma vez que esse processo está relacionado diretamente com a manutenção dessas doenças. A análise das proteínas relacionadas com a angiogênese sugerem que elas também podem desempenhar um papel importante na patogênese do líquen plano oral e de outras doenças autoimunes crônicas inflamatórias como o pênfigo vulgar (TAO *et al.*, 2007; SCARDINA *et al.*, 2007; SCARDINA *et al.*, 2009).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) é um importante promotor da angiogênese que estimula a migração de células endoteliais e a geração de novos vasos a partir do endotélio vascular já existente nos tumores. Entre todos os tipos de VEGF's, o VEGF-A é a proteína angiogênica mais potente tanto na angiogênese normal quanto na patológica. Ele é gerado como isoformas de *splices* múltiplos em tecidos normais e patológicos, dando origem a duas famílias conhecidas de proteínas isofórmicas, uma desempenhando papel angiogênico, VEGF_{xxx}a, e outra um papel antiangiogênico, VEGF_{xxx}b (HAPER *et al.*, 2008; DEGHANIAN *et al.*, 2014).

Alguns estudos têm mostrado que o VEGF165b inibe o crescimento e a proliferação das células endoteliais *in vitro*, a angiogênese tumoral e a angiogênese não relacionada a tumor. Recentemente, as características funcionais e estruturais das isoformas angiogênicas e antiangiogênicas do VEGF-A têm se tornado de grande interesse devido aos seus importantes papéis na saúde e nas doenças, uma vez que o fenótipo vascular, tanto na angiogênese patológica quanto na fisiológica, podem depender do balanço das isoformas do VEGF (KONOPATSKAYA *et al.*, 2006; CLAPP *et al.*, 2009; BATES *et al.*, 2013).

Deste modo, esse trabalho tem o objetivo de avaliar a expressão imunoistoquímica do VEGF165 (angiogênico) e do VEGF165b (antiangiogênico) em uma série de casos de líquen plano oral e pênfigo vulgar, na tentativa de contribuir para o entendimento da participação da angiogênese na patogênese e na manutenção dessas doenças crônicas inflamatórias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LÍQUEN PLANO ORAL

2.1.1 Considerações Gerais, Aspectos Clínicos e Histopatologia

A descrição clínica inicial do líquen plano é geralmente atribuída a Ferdinand Ritter von Hebra, que a denominou como “lichen ruber planus” em 1860. A definição clínica foi redefinida através do trabalho de Erasmus Wilson e Moritz Kaposi, sendo Wilson o primeiro a simplificar o nome para “líquen plano”. Alguns anos após, Louis Wickham, em 1895, caracterizou as estriações brancas no LP cutâneo. É útil reconhecer que desde o momento da sua identificação inicial, o LPO foi discutido, estudado e diagnosticado por 40 anos como um distúrbio clínico sem qualquer caracterização histopatológica, uma vez que microscopicamente estas ainda não haviam sido delineadas até o trabalho de William Dubreuilh em 1906 (CHENG *et al.*, 2016).

O líquen plano oral é um subtipo de Líquen Plano, caracterizado por uma doença mucocutânea mediada imunologicamente, relativamente comum, com prevalências, na população mundial, que variam de 0,22 a 5%, e com incidência estimada acima de 2,2% (GOROUHI *et al.*, 2014; DE ROSSI *et al.*, 2014). Pacientes com idade entre 30 e 60 anos apresentam maior risco de desenvolver o LPO, com uma forte predileção para o sexo feminino (EBRAHIMI *et al.*, 2011; USATINE *et al.*, 2011).

Pacientes com LPO frequentemente apresentam apenas manifestações orais (AL-HASHIMI *et al.*, 2007), entretanto 25% deles apresentam lesões afetando vulva e vagina. Outros sítios de acometimento incluem unhas, couro cabeludo, esôfago e olhos (USATINE *et al.*, 2011). Apenas uma minoria dos pacientes com LPO, aproximadamente 15%, desenvolvem lesões em pele (AL-HASHIMI *et al.*, 2007; CARROZZO *et al.*, 2009). Por sua vez, 60% dos pacientes com LP cutâneo expressam lesões orais (PARASHAR, 2011; DE ROSSI *et al.*, 2014).

Geralmente, as lesões de líquen plano podem acometer qualquer região da cavidade oral, mas a mucosa jugal posterior é o local mais comum de acometimento, seguido pelas bordas laterais da língua, gengiva, mucosa labial e vermelhão do lábio inferior, apresentando-se como lesões bilaterais, simétricas ou múltiplas. São raras as lesões no palato, lábio superior

e assoalho bucal (CARROZZO *et al.*, 2009; ROOPASHREE, *et al.*, 2010; EBRAHIMI *et al.*, 2011).

Clinicamente, existem seis diferentes subtipos de LPO descritos na literatura, os quais são categorizados em dois grupos: as formas atróficas não erosivas (chamadas de lesões brancas: reticular, em placa e papular); e as formas atróficas erosivas (chamadas de lesões vermelhas: atrófico [eritematoso], erosivo [ulcerativo] e bolhoso) (ISMAIL *et al.*, 2007).

O tipo mais comum de LPO é a de padrão reticular, podendo se apresentar como pápulas, placas e com um rendilhado entrelaçado de linhas ceratóticas conhecidas como “estrias de Wickham”, as quais se apresentam tipicamente simétricas e bilaterais. Qualquer sítio da mucosa oral pode ser afetado por esse tipo de LPO, embora seja mais frequentemente encontrado na mucosa jugal (KALMAR, 2007; USATINE *et al.*, 2011). Por sua vez, a forma erosiva, ainda que não seja tão comum quanto a reticular, é mais significativa para o paciente, pois as lesões são comumente sintomáticas. De forma geral, são difusas, avermelhadas, ulceradas e exibem estrias ceratóticas esbranquiçadas circundando-as. Essas estrias irradiam perifericamente e são usualmente evidentes nas margens das zonas atróficas da lesão (KALMAR, 2007; ANURADHA, 2008). A ulceração consequente dessas lesões pode ser infectada secundariamente por *cândida* (PATEL *et al.*, 2016).

Talvez, doença alguma no campo da patologia oral e médica tenha gerado mais discussão e controvérsias do que o líquen plano oral. Embora muitos esforços tenham sido investidos em estudos clínicos, patológicos e em pesquisas de ciência básica, resultados inconsistentes e diversas opiniões ainda deixam perguntas não respondidas sobre etiologia, patogênese e potencial pré-maligno dessas lesões. Enquanto este fato obviamente aponta para necessidade de mais pesquisas sobre o LPO, as investigações devem basear-se num diagnóstico preciso e confiável, o que pode ser um desafio (CHENG *et al.*, 2016).

Mesmo que a etiologia do LPO ainda seja desconhecida, várias causas diferentes têm sido atribuídas à sua etiopatogenia, sendo as principais os agentes microbianos, estresse psicológico, hipersensibilidade local e sistêmica mediada por células e resposta imune. Fortes evidências sugerem uma associação entre o vírus da hepatite C com LPO (ALAIZARI *et al.*, 2016). Lesões de LPO parecem estar associadas com reações imunomediadas contra um antígeno exógeno ou um autoantígeno expresso pelas células epiteliais (PATEL *et al.*, 2016). O papel de uma desregulação da imunidade tem sido amplamente demonstrado tanto para os

componentes inatos (citocinas, sistema complemento, APCs, linfócitos NK, mastócitos) quanto para os adquiridos (linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$), sendo o efeito final a destruição dos ceratinócitos da camada basal (FARHI & DUPIN, 2010; ROOPASHREE, *et al.*, 2010). Os linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$) são primariamente responsáveis pela sustentação da inflamação e a destruição das células epiteliais, embora os linfócitos T *helper* ($CD4^+$) também estejam ativos no LPO (ROOPASHREE *et al.*, 2010; MIROWSKI *et al.* 2017).

Nos últimos anos tem-se estudado bastante a respeito da interação entre as células T e os produtos dos mastócitos, os quais desempenham um importante papel na regulação de respostas imunes, colaborando fortemente na imunopatogênese do LPO. As células epiteliais da camada basal alteradas antigenicamente estimulam os mastócitos mucosos através das RANTES. Essa estimulação faz com que os mastócitos apresentem o antígeno para as células T, as quais na sequência, promovem a degranulação dos mastócitos e a liberação de vários fatores como o $TNF-\alpha$, uma série de interleucinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-13 e IL-16), quimase e triptase (RAMALINGAM *et al.*, 2018). Desse modo, existe uma consciência crescente de que os linfócitos T da mucosa oral e os mastócitos interagem na manutenção da cronicidade e na patogênese do LPO.

Quando desenvolvida a lesão, o $TNF-\alpha$, derivado dos mastócitos ativa as células T, que por sua vez secreta, RANTES e MMP's. As RANTES provem a continuada degranulação dos mastócitos, enquanto as MMP's preparam o endotélio e a matriz do tecido conjuntivo ao redor para a migração das células T (SHARMA *et al.*, 2011).

Nas áreas de ruptura da camada basal do LPO, a presença de mastócitos e de células T $CD8^+$ em região intraepitelial aponta para a importância do papel dessas células na patogênese dessa doença (RAMALINGAM *et al.*, 2018).

Os aspectos clínicos característicos do líquen plano oral são, na maioria das vezes, suficientes para o diagnóstico correto da doença. Em lesões clássicas é possível fazer o diagnóstico baseado apenas nas características clínicas (ISMAIL *et al.*, 2007). Ainda assim, a biópsia associada ao exame histopatológico é recomendada para confirmar o diagnóstico clínico e, principalmente, para descartar outras doenças similares, incluindo displasias e neoplasias (BUAJEEB *et al.*, 2015).

Os achados histopatológicos clássicos do líquen plano incluem: liquefação da camada basal, acompanhada por um intenso infiltrado linfocitário disposto em faixa, imediatamente

subjacente ao epitélio; presença de numerosos corpúsculos colóides eosinofílicos na interface epitélio/tecido conjuntivo (corpos de Civatte); cristas interpapilares ausentes, hiperplásicas ou, mais frequentemente, em forma de “dentes de serra”; variações da espessura da camada espinhosa e graus variáveis de orto ou paraceratose (NEVILLE *et al.*, 2016). Comparada com as lesões cutâneas, as lesões em mucosa oral exibem menos frequentemente as projeções epiteliais em forma de “dentes de serra” e com mais frequência apresentam atrofia epiteliais (GOROUHI *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2016).

A imunofluorescência direta (IFD) é uma técnica diagnóstica avançada que detecta a presença, bem como a localização dos autoanticorpos nos espécimes de biópsia (BUAJEEB *et al.*, 2015). Mesmo assim, a maioria dos clínicos preferem lançar mão dessa ferramenta apenas para pacientes que não apresentam características clínicas clássicas do LPO, as quais não se pode diferenciar de outras doenças mucocutâneas, como o penfigóide de membranas mucosas (PATEL *et al.*, 2016).

O diagnóstico diferencial do LPO é extenso e inclui queratose friccional, candidíase hiperplásica crônica, pênfigo de membranas mucosas e pênfigo vulgar oral (USATINE *et al.*, 2011; BUAJEEB *et al.*, 2015; NEVILLE *et al.*, 2016). Existem outras lesões que se assemelham ao LPO tanto clínica quanto histopatologicamente e são denominadas de lesões liquenóides orais, que abrangem as lesões liquenóides orais de contato, as reações medicamentosas liquenóides orais e as lesões liquenóides orais da doença do hospedeiro versus enxerto (PATEL *et al.*, 2016).

Em um estudo retrospectivo no qual foi avaliado a transformação maligna em 23 casos de LPO realizado por Fang e colaboradores (2009), observou-se que os sintomas mais frequentemente encontrados eram a erosão e a dor, sendo a dor severa uma consequência da erosão. Tendo em vista esse e outros estudos, como uma recente revisão sistemática de Fitzpatrick *et al.*, 2014, que observam a transformação maligna em lesões clássicas de LPO, acredita-se que os tipos de LPO que têm uma maior tendência de sofrer transformação maligna são erosivos. Isso é justificado pelo fato de que as formas erosivas deixam a mucosa com uma maior predisposição para sofrer danos por agentes carcinogênicos (VAN DER MEIJ *et al.*, 2003). Desse modo, o aumento da microdensidade vascular nos casos de LPO erosivo quando comparado com os casos de LPO reticular pode ser sugerido como um dos fatores que contribuem para o possível potencial de malignidade nas lesões erosivas (MITTAL *et al.*, 2012).

O manejo adequado dos pacientes com LPO tem sido explorado em várias publicações recentes e é orientada pela severidade dos sintomas e pela extensão da mucosa oral envolvida (PARASHAR, 2011; AU *et al.*, 2013; PATEL *et al.*, 2016). A importância da orientação do paciente antes do tratamento é bastante enfatizada uma vez que a terapia não é curativa, mas direcionada ao controle da inflamação e a redução dos sintomas associados. E por se tratar de uma lesão potencialmente maligna precisa e de longos períodos de acompanhamento além da realização de novas biópsias periodicamente (PATEL *et al.*, 2016). O tratamento é longo e o sua contínua manutenção é necessária. Além disso, tendo em vista que existem diferentes respostas de cada paciente para terapias específicas, o uso de vários regimes de tratamento pode ser necessário antes que o controle dos sintomas seja alcançado (CHENG *et al.*, 2016).

Uma ampla variedade de terapias é descrita para o controle do LPO, incluindo corticosteroides tópicos, localmente injetáveis e sistêmicos, dentre outros. Sendo as medicações tópicas as modalidades de tratamento preferidas. A validade da escolha dentre as opções de tratamento é dificultada pela escassez de publicações relevantes de estudos duplamente cegos e placebo controlados e a ausência de um consenso sobre a medida da atividade da doença (AU *et al.*, 2013; O'NEILL *et al.*, 2013; THONGPRASOM *et al.*, 2013; DE ROSSI *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2016; PATEL *et al.*, 2016).

As lesões mais dolorosas do LPO, atróficas/erosivas, podem comprometer a higiene oral, portanto um efetivo controle do biofilme pode reduzir os sintomas. Estudos têm mostrado uma melhora nos sintomas de LPO quando pacientes seguiram um meticuloso protocolo de higiene oral e visitaram frequentemente o cirurgião-dentista para remoção de cálculos e controle de placa bacteriana. Melhores resultados são alcançados quando uma boa higiene oral é combinada com terapia corticosteroide tópica (SALGADO *et al.*, 2013; STONE *et al.*, 2013).

2.2 PÊNFIGO VULGAR

2.2.1 Considerações Gerais, Aspectos Clínicos e Histopatologia

O pênfigo é a designação de um conjunto de entidades patológicas de etiologia autoimune, de incidência rara, caracterizada pela formação de bolhas intraepiteliais na pele e em mucosas (nariz, conjuntiva, genitálias, esôfago, faringe e laringe), sendo encontrada

principalmente em pessoas de meia idade e idosos (BLACK *et al.*, 2005). Na boca, as lesões são encontradas com maior frequência em áreas mais sujeitas ao trauma friccional como mucosa jugal, palato e gengiva, e se apresentam como bolhas que se rompem facilmente e formam erosões difusas e ulcerações (PATEL *et al.*, 2016).

Existem diferentes variantes do pênfigo descritas na literatura, apresentando distintos perfis de autoanticorpos e manifestações clínicas. Os quatro tipos principais são: pênfigo vulgar, pênfigo foliáceo, pênfigo por IgA e pênfigo paraneoplásico (NEVILLE *et al.*, 2016; PATEL *et al.*, 2016). Usualmente o indivíduo desenvolve uma única variante do pênfigo, embora casos tenham sido descritos de transição para outra variante (ISHII *et al.*, 2000), além de outros em que as manifestações clínicas de uma única variante poder mudar ao longo do tempo (BLACK *et al.*, 2005). Esta mudança pode estar relacionada às alterações nas proporções dos autoanticorpos contra as desmogleínas 1 e 3 (HARMAN *et al.*, 2001).

O pênfigo vulgar é o mais comum dos tipos de pênfigo. Entretanto, sua ocorrência é rara, com incidência estimada na população geral de 0,1 a 0,5 por 100.000 pessoas diagnosticadas a cada ano (MCMILLAN *et al.*, 2015). Este tipo ocorre raramente antes da terceira década de vida, sendo a média de idade no momento do diagnóstico de 50 anos, embora casos raros possam ser vistos na infância. Ao contrário do LPO, afeta ambos os sexos igualmente, ainda que alguns autores tenham reportado uma maior prevalência em mulheres (KERSHENOVICH *et al.*, 2014; MCMILLAN *et al.*, 2015).

Aproximadamente 75% dos casos de PV revelam-se inicialmente na mucosa oral, cujas lesões precedem as cutâneas em um período de até um ano ou mais (ENDO *et al.*, 2005). O curso é crônico e o envolvimento sistêmico pode ocorrer se o tratamento adequado não for fornecido (CAMACHO-ALONSO *et al.*, 2005).

Ao exame físico é observada a formação de bolhas e vesículas de diâmetros variáveis, de ocorrência superficial ou profunda, de conteúdo seroso claro, purulento ou sanguinolento, que uma vez rompidas originam erosões superficiais irregulares, com coloração avermelhada, sintomatologia dolorosa, sendo logo recobertas por um tipo de pseudomembrana e circundadas por um eritema difuso. Todavia, é raro o paciente relatar a presença de bolhas ou vesículas intraorais e as lesões dificilmente podem ser detectadas pelo exame clínico devido à rápida ruptura do teto fino e friável das bolhas (NEVILLE *et al.*, 2016).

O aumento da salivação e o incômodo ao mastigar, ao engolir e ao falar são as principais queixas dos pacientes com lesões de pênfigo vulgar oral, além de ardor intenso e odor fétido (SCULLY *et al.*, 2002).

O elemento semiotécnico para um diagnóstico mais simples do pênfigo vulgar é a verificação do sinal de Nikolsky. Este é positivo quando ocorre a formação de uma bolha ao se friccionar o epitélio nas proximidades das lesões já existentes, devido à facilidade de separação das células epiteliais. Embora esse sinal seja de grande valia, não é patognomônico do pênfigo vulgar, podendo ser observado na grande maioria das lesões vesículo-bolhosas (KERSHENOVICH *et al.*, 2014; MCMILLAN *et al.*, 2015; BASCONES-MARTINEZ *et al.*, 2015).

O epitélio oral é muito semelhante à pele, mas difere em alguns aspectos como a constituição dos componentes desmossomais, uma vez que as moléculas de adesão do tipo caderina Dsg1 e Dsg3 são ambas expressas na pele e na mucosa oral, porém, nessa última, a Dsg3 se encontra em maiores concentrações do que a Dsg1 (LANZA *et al.*, 2006; STOOPLER *et al.*, 2014).

Embora a etiologia do pênfigo vulgar ainda não esteja completamente esclarecida, sabe-se que um mecanismo autoimune com o envolvimento de autoanticorpos pode alterar as junções epiteliais intercelulares. Esses autoanticorpos, mais especificamente o IgG1 e o IgG4, agem contra as glicoproteínas desmogleína 1 e desmogleína 3. O IgG4 foi encontrado de forma mais dominante nos estágios agudos, enquanto o IgG1 nas fases de remissão das lesões de PV (AOYAMA *et al.*, 2010).

Usualmente, a Dsg3 é expressa preferencialmente na região parabasal do epitélio oral, enquanto a Dsg1 encontra-se principalmente na porção superficial da epiderme. Portanto, pacientes que desenvolvem autoanticorpos direcionados contra a Dsg3 com ou sem envolvimento da Dsg1 mostrará histopatologicamente fenda intraepitelial acima da camada basal, e clinicamente apresentará bolhas na mucosa oral afetada. Por outro lado, pacientes que desenvolvem autoanticorpos diretamente contra a Dsg1 mostrará histopatologicamente fendas intraepiteliais superficiais na epiderme, mas a mucosa oral não será afetada (MADALA *et al.*, 2017).

A desmocolina 3 (Dsc3) também é uma proteína desmossomal que se encontra expressa nas camadas basal, espinhosa e granular e foi evidenciada também contribuir para o

desenvolvimento das lesões de pêfigo (SPINDLER *et al.*, 2009). Além disso, alguns poucos estudos mostraram até mesmo que anticorpos anti-mitocondriais podem penetrar nos ceratinócitos e reagir com as proteínas mitocondriais, podendo ser um dos fatores causadores da acantólise no pêfigo (MARCHENKO *et al.*, 2010). Esses relatos específicos evidenciam que o pêfigo é uma doença complexa, instigada por pelo menos três classes de autoanticorpos direcionados contra proteínas desmossomais, não-desmossomais, mitocondriais e outros autoantígeno dos ceratinócitos (MADALA *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas tem-se esclarecido os mecanismos de separação dos ceratinócitos (acantólise) no pêfigo. Pesquisas mostraram que a apoptose pode possivelmente ser responsável pelos mecanismos causadores da acantólise no PV (WANG *et al.*, 2004), por meio da ativação da sinalização apoptótica através do IgG (FRUSIC-ZLOTKIN *et al.*, 2006) e do anticorpo do receptor anti-Fas (FasR) (SCHMIDT *et al.*, 2009). Sugerindo que o dano estrutural (acantólise) e a morte (apoptose) dos ceratinócitos no pêfigo são influenciados pelo mesmo grupo de enzimas de morte celular (MADALA *et al.*, 2017).

O primeiro evento para o desenvolvimento das lesões de PV, começa com a ligação dos autoanticorpos patogênicos com as Dsg nos ceratinócitos. Desse modo, inicia-se uma cascata de morte celular programada essencialmente nos ceratinócitos da camada basal e parabasal. Uma acantólise precoce é então estabelecida por encolhimento das células da camada basal devido a retração dos tonofilamentos clivados por caspases, e a dissociação dos complexos de adesão interdesmossomais, causados tanto pela fosforilação das moléculas de adesão quanto pela clivagem das caudas citoplasmáticas das caderina transmembrana pelas caspases. Por fim, uma acantólise avançada ocorre devido a uma degradação contínua e a um colapso das proteínas estruturais, incluindo as Dsgs, pelas mesmas enzimas de morte celular (MADALA *et al.*, 2017).

Isso resulta da separação e divisão dos desmossomos pré-existentes das membranas das células por forças de cisalhamento, separando as células em colapso e estimulando a produção de anticorpos de eliminação. Então, o arredondamento (células de Tzank) e a morte apoptótica das células acantolíticas na região inferior do epitélio resulta da destruição irreversível das proteínas mitocondriais e nucleares pelas mesmas enzimas de morte celular (MADALA *et al.*, 2017).

Fatores genéticos também podem estar envolvidos na etiologia do PV, uma vez que certos grupos étnicos - judeus e populações do mediterrâneo – são particularmente mais suscetíveis (MCMILLAN *et al.*, 2015). Em uma meta-análise realizada por Yan e colaboradores (2012), relatou-se que os alelos HLA-DRB1 específicos foram responsáveis por um aumento da resistência e susceptibilidade para o desenvolvimento do PV. Contudo, existem fatores agravantes ou precipitantes necessários para que o PV possa se desenvolver e esses fatores podem ser endógenos como defeitos imunológicos e malignidades; e exógenos como vírus, medicamentos, exposição à pesticidas, dieta e estresse (JOLLY *et al.*, 2010; BASCONES-MARTINEZ *et al.*, 2015).

O diagnóstico do PV geralmente é baseado nas manifestações orais, enquanto a confirmação é fornecida pelos achados histopatológicos, imunopatológicos e/ou sorologia (PATEL *et al.*, 2016). Os espécimes da biópsia do tecido perilesional caracterizam-se microscopicamente por uma separação intraepitelial (vesícula ou bolha intraepitelial) acima da camada basal das células do epitélio, sendo que esta permanece aderida à lâmina própria subjacente. No espaço vesicular são encontrados, com frequência, grupos de células que apresentam alterações degenerativas tais como tumefações dos núcleos, perda dos desmossomos, formato arredondado ou ovóide e hipercromatismo, sendo denominadas de células de Tzanck. No tecido conjuntivo podem ser encontrados leucócitos polimorfonucleares e linfócitos em número variados. E ao contrário da maioria das doenças bolhosas, o pênfigo vulgar é caracterizado por escassez de infiltrado inflamatório no líquido da vesícula, exceto nos casos onde existe infecção secundária (NEVILLE *et al.*, 2016).

A avaliação da imunofluorescência direta (IFD) do espécime de biópsia de tecido perilesional fresco revela deposição intercelular de IgG ou IgM e fragmentos de complemento no espaço intercelular, sendo esse método de diagnóstico também considerado essencial, juntamente com o exame histopatológico, para a confirmação do diagnóstico (BLACK *et al.*, 2005). Testes sorológicos, que incluem o ELISA, detectam anticorpos circulantes no sangue (KERSHENOVICH *et al.*, 2014; MCMILLAN *et al.*, 2015). A IFD é a técnica mais sensível, portanto continua sendo o padrão ouro para a detecção dos autoanticorpos nas lesões de PV (GIURDANELLA *et al.*, 2016).

Os critérios de diagnóstico para o PV compreendem os critérios obrigatórios, critérios essenciais e critérios dispensáveis. O critério obrigatório é a presença de deposição do IgG com ou sem complemento (C3) na superfície das células epiteliais detectados pela IFD. Os

critérios essenciais incluem a presença de bolhas e/ou erosões na mucosa, pele ou em ambas; e bolhas intraepidermais com acantólise detectadas pelo histopatológico. Entre as características dispensáveis estão a deposição de IgG detectado pela IFD, a presença de Dsg3 com ou sem a Dsg1, detectada por ELISA e a presença de bandas de Dsg3 com ou sem Dsg1 detectado por *imunoblotting*. Para um diagnóstico ideal de PV, o critério obrigatório deve ser completo juntamente com ambos os critérios essenciais ou com um critério essencial e um critério dispensável (KERSHENOVICH *et al.*, 2014).

O pênfigo pertence a um grupo de doenças vesículo-bolhosas autoimune órgão-específico com potencial risco de vida (MADALA *et al.*, 2017). Antes da década de 1950, período no qual os corticosteroides orais foram introduzidos pela primeira vez, o PV apresentava uma taxa de mortalidade de 90%. Desde então, as opções de tratamento melhoraram significativamente as taxas de mortalidade e a morbidade dessa doença. O tratamento do PV visa reduzir os sintomas - formação de bolhas e úlcera - e a cicatrização da mucosa. Assim como o LPO, o PV é uma doença de curso vitalício sem cura. E uma consulta médica com o dermatologista é crucial para avaliar a extensão sistêmica do envolvimento da doença (MCMILLAN *et al.*, 2015).

Pode-se lançar mão de agentes imunomoduladores tópicos e sistêmicos para tratar o PV que são similares aqueles usados nas lesões de LPO. A primeira linha de tratamento para as lesões orais de PV inclui corticosteroides tópicos, enquanto que na segunda linha de tratamento estão os inibidores de calcineurina (MARTIN *et al.*, 2009). O tratamento sistêmico é usualmente necessário. Uma combinação de corticoides tópicos e agentes sistêmicos pode ser considerada em pacientes mais resistentes (INGEN-HOUSZ-ORO *et al.*, 2015).

Quanto maior a precocidade do diagnóstico, mais cedo o tratamento poderá ser iniciado, permitindo a administração de doses menores de corticosteroides para controlar a doença, reduzindo, desse modo as reações adversas e melhorando o prognóstico (BLACK *et al.*, 2005; AMORMINO *et al.*, 2010).

Assim como em pacientes com lesões de LPO atrófico/erosivo, profilaxias frequentes com um cirurgião-dentista e a manutenção da higiene oral são importantes para controlar os sintomas das lesões em pacientes que apresentam lesões de PV com envolvimento gengival. Esses pacientes podem apresentar grandes quantidades de biofilme e cálculos dentais devido a

dificuldade de escovação e do uso do fio dental. Logo, é interessante que os mesmos sejam bem orientados quanto a esses aspectos (GAMBINO *et al.*, 2014).

2.3 ANGIOGÊNESE

2.3.1 Considerações Gerais

A formação de novos vasos sanguíneos pode ocorrer pelos processos de vasculogênese ou angiogênese. A vasculogênese consiste no surgimento de vasos sanguíneos *de novo* a partir de precursores celulares, os quais se diferenciam em células endoteliais, formam lúmens e originam uma rede vascular primitiva. Por sua vez, a angiogênese representa a formação de novos vasos sanguíneos a partir da migração e proliferação de células endoteliais da vasculatura pré-existente (CLAPP *et al.*, 2009; NIKITENKO, 2009; UCUZIAN *et al.*, 2010).

O surgimento de novos vasos sanguíneos é um processo altamente complexo e coordenado, envolvendo a atuação de fatores pró e antiangiogênicos. Em adultos, sob condições fisiológicas, a angiogênese ocorre apenas durante processos relacionados ao ciclo menstrual, gestação e reparo tecidual. Dessa forma, normalmente, fatores antiangiogênicos mantêm o endotélio em um estado quiescente. Porém, em processos patológicos como artrite reumatoide, psoríase, retinopatia diabética, doença hepática policística, degeneração macular relacionada à idade, asma, aterosclerose e câncer, o delicado balanço entre fatores pró e antiangiogênicos é alterado em favor da formação de novos vasos sanguíneos (CLAPP *et al.*, 2009; NIKITENKO, 2009; GORDON *et al.*, 2010). Por sua vez, outras patologias, como isquemias cerebral e cardíaca, e doenças neurodegenerativas estão caracterizadas por angiogênese insuficiente e/ou regressão vascular anormal (CLAPP *et al.*, 2009).

Por muito tempo acreditou-se que a angiogênese a partir de células endoteliais de vasos pré-existent fosse o único mecanismo pelo qual novos vasos sanguíneos seriam formados em adultos. No entanto, Asahara *et al.* (1997) identificaram células presentes na circulação periférica as quais eram mobilizadas a partir da medula óssea e endereçadas à sítios angiogênicos, sugerindo um envolvimento potencial destes tipos celulares na angiogênese. A descoberta destes precursores revolucionou o campo da biologia vascular e impulsionou a identificação de outros tipos celulares capazes de dar origem às células endoteliais. Dessa

forma, verificou-se que células-tronco mesenquimais localizadas em diversos órgãos e tecidos como no tecido adiposo, parede de vasos sanguíneos, baço, fígado e intestino podem se diferenciar em células endoteliais, constituindo um verdadeiro *pool* de precursores endoteliais (ZAMPETAKI *et al.*, 2008; TILKI *et al.*, 2009).

2.3.2 Angiogênese nas Lesões de Líquen Plano Oral e Pênfigo Vulgar.

O processo angiogênico é considerado fundamental em muitos processos fisiológicos e patológicos e, em ambos os tipos o início da resposta angiogênica ocorre com uma ativação das células endoteliais devido à liberação de citocinas como resposta à hipóxia ou à isquemia (SCARDINA *et al.*, 2009). A angiogênese está diretamente relacionada a uma alteração na microcirculação local, que consiste basicamente em um aumento no número de vasos em uma determinada área e uma alteração morfológica dos mesmos, culminando na expressão *in vivo* da neoformação de vasos sanguíneos (SCARDINA *et al.*, 2007).

Além de a angiogênese ter sido relacionada com a patogenia e atividade de uma série de condições crônicas inflamatórias, incluindo artrite reumatoide, psoríase e osteoartrite; outros dados sugerem que a angiogênese pode desempenhar um papel importante na persistência e cronicidade de algumas lesões do líquen plano oral, podendo, desse modo, ser utilizado como um marcador de atividade da doença (TAO *et al.*, 2007).

Uma relação de *feedback* positivo, em que um estado inflamatório promove a angiogênese e esta facilita a inflamação crônica foi observada em doenças crônicas inflamatórias (CREAMER *et al.*, 2002). Por esse motivo é necessário elucidar o papel da angiogênese na patogênese da LPO a fim de se melhor compreender o seu mecanismo para que sejam desenvolvidas novas estratégias de tratamento (TAO *et al.*, 2007).

O LPO caracteriza-se por uma ciclicidade, com fases de remissão e recrudescência, desse modo, modificações na microcirculação local podem ser associadas a uma maior ou menor intensidade do fenômeno flogógeno e, por conseguinte, a uma maior ou menor atividade da doença. Dados da literatura indicam que, na presença da LPO, os vasos sanguíneos encontram-se dilatados, portanto eles ocupam um espaço relativamente maior, todavia isso não corresponde a um aumento do número dos mesmos (SCARDINA *et al.*, 2007).

O estresse do retículo endoplasmático levando ao desdobramento de uma proteína promove uma resposta que pode modular a angiogênese via condução da transcrição do VEGFA, poderia ser uma maneira pela qual explicar-se-ia a relação da angiogênese com o LPO. O VEGF é considerado um dos mediadores mais potentes da angiogênese, uma vez que se trata do fator de maior estimulação específica da célula endotelial (GOSH *et al.*, 2010; BINET *et al.*, 2015). A maioria dos estudos da literatura demonstraram que as lesões de LPO apresentam um aumento significativo de VEGF e CD34 quando comparado à mucosa oral normal (TAO *et al.*, 2007; MITTAL *et al.*, 2012; AL-HASSINY *et al.*, 2018).

Outro fator contribuinte para a relação do LPO com a angiogênese é a supra-regulação das moléculas de adesão das células endoteliais no LPO pelo fator de necrose tumoral (TNF- α). As moléculas de adesão vasculares (VCAM1 e ICAM1), que permitem a interação entre as células endoteliais e os linfócitos, têm sido evidenciadas estarem expressas mais significativamente em LPO quando comparados com mucosa oral normal, influenciando potencialmente a migração dos linfócitos dos vasos sanguíneos para o microambiente local (SEYEDMAJIDI *et al.*, 2013). Uma das fontes do TNF- α são os mastócitos, presentes em densidade aumentada em lesões de LPO e situados em sua maioria em região subepitelial e próximos a vasos sanguíneos. A degranulação dos mastócitos é um evento significativo na patogênese do LPO, pressionando os vasos sanguíneos para a liberação dos linfócitos e de quimiocinas que ativam as células T (SHARMA *et al.*, 2011).

Cunha *et al.* (2004) e Lee (2011) observaram, em seus respectivos casos clínicos relatados, uma significativa remissão das lesões de pênfigo vulgar após o uso oral da talidomida; sendo notado também o retorno das mesmas quando o uso desse medicamento era interrompido. Porém, os mecanismos pelos quais a talidomida age no pênfigo ainda não estão esclarecidos. Especula-se que esse medicamento exerce seus benefícios clínicos no PV através dos efeitos citocinas-moduladores e que agentes imunossupressores podem interferir nesses efeitos da talidomida.

A talidomida apresenta importantes propriedades farmacológicas, que incluem efeitos anti-inflamatórios, imunomodulatórios e antiangiogênicos, que mostram um notável valor no tratamento de várias doenças, até mesmo do câncer (ZHOU *et al.*, 2013). Uma vez que se observou que essa inibição ocorre apenas após a administração oral da talidomida, surgiu a hipótese de que um metabólito ativo é formado *in vivo* (MATHEWS & MCCOY, 2003). A talidomida suprime, nos macrófagos, a produção de TNF- α , que é fracamente angiogênico *in*

vivo; e age secundariamente induzindo uma inflamação. Hipotetizou-se, então, que os efeitos antiangiogênicos da talidomida não opera através da supressão da produção de TNF- α , já que essa via não mostrou ser significativa nessa questão, mas sim por meio da inibição do VEGF, um componente essencial da angiogênese (D'AMATO *et al.*, 1994; KRUSE *et al.*, 1998).

Miyamoto e colaboradores (2017; 2018) analisaram níveis séricos de VEGF em pacientes de pêfígo - principalmente o pêfígo foliáceo - e o pêfígo vulgar, sendo essas avaliações em tecidos que ainda não sofreram o dano tecidual (eritrodermia) causado por essa doença. E é observado que existe um aumento nos níveis séricos do VEGF nos pacientes de PV, mas que também há um aumento da endogлина, molécula que além de induzir a angiogênese, induz a repitelização que pode potencialmente prevenir o desenvolvimento da eritrodermia nesses pacientes.

O aumento do nível sérico de VEGF tem sido demonstrado em doenças bolhosas autoimunes como o pêfígo bolhoso, o pêfígo foliáceo e o pêfígo vulgar (AMEGLIO *et al.* 1997; MIYAMOTO *et al.*, 2017; MIYAMOTO *et al.*, 2018). No pêfígo foliáceo, os níveis de VEGF circulantes correlaciona-se com a atividade da doença, especialmente durante a eritrodermia, que se caracteriza pela fase de descamação da pele provocada pela doença (MIYAMOTO *et al.*, 2017).

A expressão do VEGF é regulada pela endogлина, um marcador de angiogênese e que também está envolvido no processo de cicatrização da pele e mucosas (LIU *et al.*, 2014). A baixa expressão de endogлина ativa vias intracelulares que inibem a proliferação dos ceratinócitos e reduzem a síntese de óxido nítrico pelas células endoteliais (BIELEFELD *et al.*, 2013; PEREZ-GOMEZ *et al.*, 2014). Portanto, a diminuição da expressão da endogлина observada no pêfígo foliáceo e na psoríase sugere que os processos de reparo estão mais prejudicados nessas doenças do que no PV, onde essa diminuição da endogлина não foi observada (MIYAMOTO *et al.*, 2018). Um desequilíbrio na expressão do VEGF leva a uma vasodilatação e um aumento na permeabilidade vascular para as células inflamatórias, possibilitando a perpetuação do dano tecidual na psoríase e no pêfígo foliáceo (BAE *et al.*, 2015).

2.4 VEGF165 (ANGIOGÊNICO) E VEGF165b (ANTI-ANGIOGÊNICO)

A angiogênese exerce um importante papel no crescimento tumoral e na progressão de doenças crônicas inflamatórias. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) é um importante promotor da angiogênese que estimula a migração de células endoteliais, o brotamento de vasos sanguíneos e a geração de novos vasos a partir do endotélio vascular já existente nos tumores. O VEGF-A é a proteína angiogênica mais potente tanto na angiogênese normal quanto na patológica (DEHGHANIAN *et al.*, 2014).

O gene humano VEGF-A está localizado no cromossomo 6p21.3. Contém 8 éxons, separados por sete íntrons e sua região de codificação abrange aproximadamente 14kb. Todas as isoformas do VEGF contêm os éxons 1 a 5 e o 8 similares, mas diferem na composição dos éxons 6 e 7 (6a, 6b, 7a, 7b) - resultando em uma família de peptídeos identificadas numericamente por seu conteúdo de aminoácidos, cada um com diferentes propriedades de ligação à heparina (RENNEL *et al.*, 2008) - que se ligam a matriz extracelular e a co-receptores de neuropilina (Fig.1) (HARRIS *et al.*, 2012).

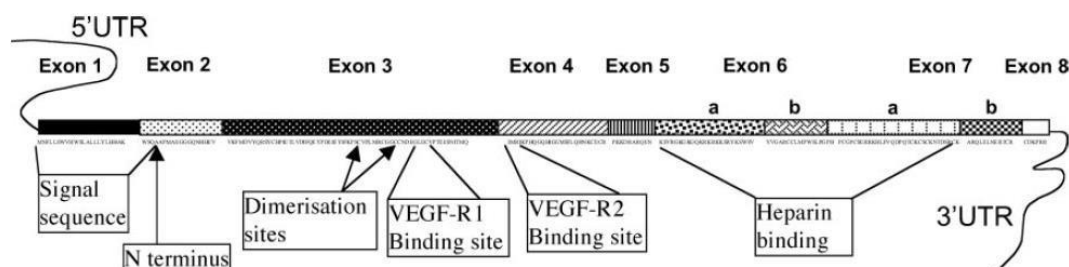


Figura 1. Estrutura exônica teórica do pré-mRNA do VEGF no qual os domínios funcionais são identificados. Éxon 1, contém a 5'- região não traduzida (URT) e sequência de sinal; éxon 2, terminação NH₂; éxon 3, domínio de dimerização e sítio de ligação do VEGFR-1; éxon 4, sítio de ligação do VEGFR-2; e éxons 5, 6 e 7, domínios de ligação da heparina (WOOLARD *et al.*, 2004).

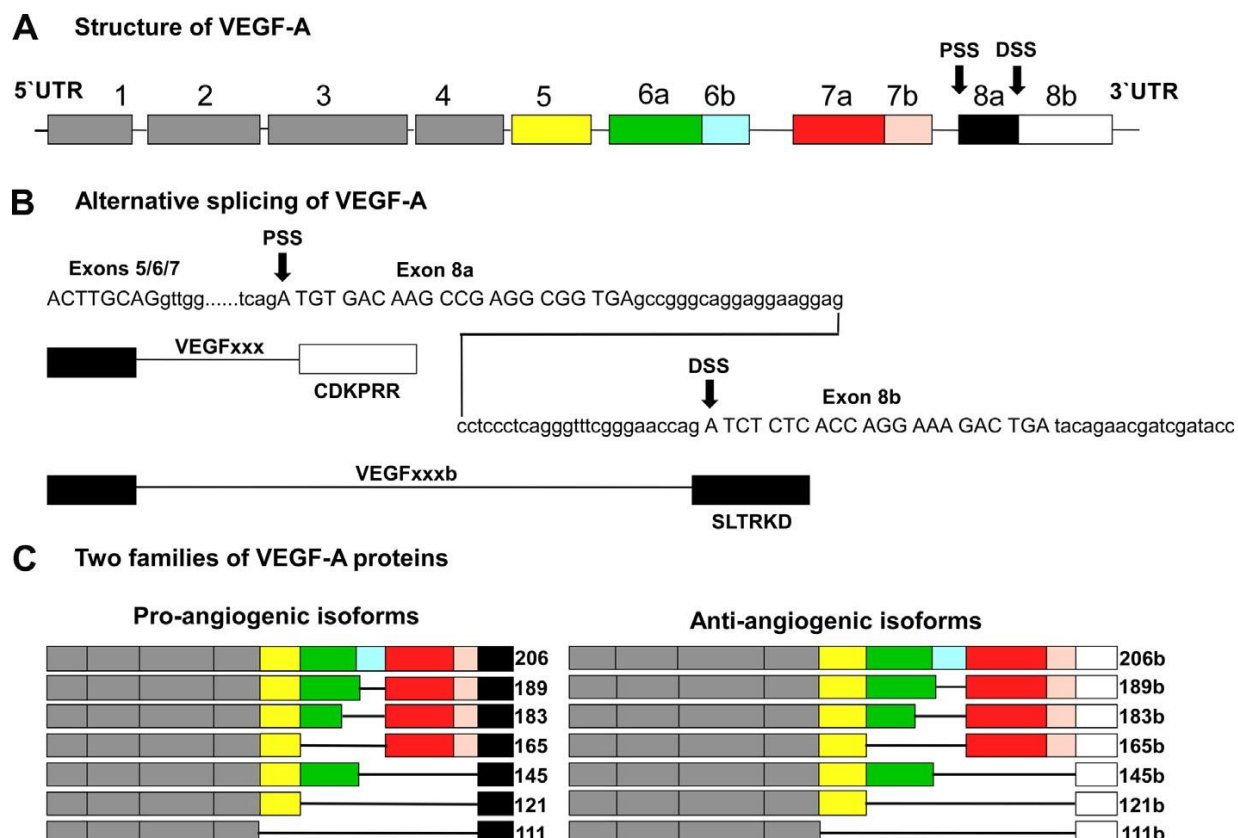


Figura 2. Estrutura do gene VEGF-A e splicing alternativo do VEGF-A geram isoformas VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b. (A) O VEGF-A contém 8 éxons. Sítio de seleção do splice proximal (PSS) na região terminal do éxon 8 gera a família pró-angiogênica VEGF_{xxx}, enquanto o sítio de seleção do splice distal resulta na família anti-angiogênica VEGF_{xxx}b. (B e C) Splicing alternativo no domínio C-terminal leva a formação de duas famílias irmãs de isoformas de VEGF-A: VEGF_{xxx} e VEGF_{xxx}b, diferindo apenas nos últimos seis aminoácidos (CDKPRR ou SLTRKD) (GU *et al.*, 2013).

O fator de crescimento endotelial vascular-A é gerado como isoformas de splices múltiplos usando sítios de splices alternativos dentro dos éxons 6, 7 e 8 em tecidos normais e patológicos (HARPER *et al.*, 2008). O *splicing* alternativo do éxon terminal (éxon 8) resulta em um mRNA contendo 18 bases codificadas pelo éxon 8b ao invés de 18 bases do éxon 8a, e consequentemente produzem proteínas de igual tamanho, mas com sequências de aminoácidos diferentes no domínio C-terminal; que dá origem a duas famílias conhecidas de proteínas isofórmicas, VEGF_{xxxxa} e VEGF_{xxx b} (Fig.2). As diferenças entre essas duas famílias de isoformas residem na deleção de 66 nucleotídeos a partir do início do éxon 8, provenientes de um sítio de *splice* alternativo (KONOPATSKAYA *et al.*, 2006; BATES *et al.*, 2013).

As formas convencionais das isoformas VEGF_{xxx}, onde xxx se refere ao número de aminoácidos, são formadas pelo sítio de seleção do *splice* proximal (PSS), elegidos no éxon 8

(denominado éxon 8a), diferentemente do *splicing* nos éxons 5, 6 e 7 (WOOLARD *et al.*, 2009). Os seis aminoácidos codificados pelo éxon 8a são CDKPRR (Fig.2). As principais isoformas da família VEGFxxx, que demonstram ser pró-angiogênica são: VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₃, VEGF₂₀₆ e VEGF₁₁₁ (BISELLI-CHICOTE *et al.*, 2012).

Entretanto, uma outra família irmã de isoformas de VEGF, genericamente referidas como isoformas VEGFxxx_b, são formadas pelo sítio de seleção do *splice* distal (DSS), de 66pb, próximo ao sítio PSS no éxon 8 (denominado éxon 8b) (BATES *et al.*, 2002; RENNEL *et al.*, 2008). O éxon 8b codifica uma única sequência de aminoácidos: SLTRKD (Fig.2).

Na família VEGFxxx_b, VEGF_{165b}, VEGF_{121b}, VEGF_{145b} e VEGF_{183b} foram identificados e demonstraram ser antiangiogênicos (WOOLARD *et al.*, 2009). O primeiro identificado e amplamente reportado membro da família VEGFxxx_b foi o VEGF_{165b}, o qual tem claramente mostrado inibir o crescimento e a proliferação das células endoteliais *in vitro*, a angiogênese tumoral e a angiogênese não relacionada a tumor (BATES *et al.*, 2002; KONOPATSKAYA *et al.*, 2006).

Quando o VEGF_{165b} foi relatado pela primeira vez, por Bates e colaboradores (2002), foi observado que o mesmo era gerado por um *splicing* distal na região C-terminal do éxon 8, levando a uma substituição de seis aminoácidos (CDKPRR para SLTRKD). A análise da sequência do gene VEGF_{165b} revela que o domínio de ligação ao receptor (VEGF-R1 e VEGF-R2) existe nos éxons 3 e 4 (Fig1). Curiosamente, os domínios de ligação e de dimerização do receptor estão intactos nessas novas isoformas, mas evidências mostram que eles não provocam a sinalização completa de pelo menos um dos seus receptores cognados, VEGFR2 (KDR/FLK1), isto é, os homodímeros VEGF_{165b} pré-formados se ligam ao receptor, mas não estimulam o crescimento endotelial, a migração e a vasodilatação dependente do endotélio, ou a fosforilação do VEGFR2 em sistemas de expressão heterólogos. Essa atividade antiangiogênica gerada pela ligação fraca com o receptor e inibição da sinalização do VEGF-R2, levou à hipótese de que o VEGF_{165b} ou a manipulação do *splicing* da região C-terminal do VEGF promove o *splicing* distal, podendo ser útil como ferramenta terapêutica no câncer (RENNEL *et al.*, 2008).

O éxon 8a tem sido identificado ser essencial para a ligação da neuropilina-1 (NRP-1) e da heparina (KAWAMURA *et al.*, 2008; GIACCA *et al.*, 2010). A isoforma VEGF_{165b}, que não possui esta porção, é incapaz de se ligar à NRP-1 resultando na redução da fosforilação da tirosina no VEGFR-2 e da sua sinalização (KAWAMURA *et al.*, 2008). Esses

efeitos são específicos para o VEGF, e implicação alguma foi observada no fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) induzido pelo crescimento das células endoteliais. Assim, o VEGF_{xxx}b parece inibir a angiogênese dependente do VEGF_{xxx}, ou pelo menos a isoforma VEGF165b pode inibir a sua contraparte, VEGF165 (KONOPATSKAYA *et al.*, 2006).

As características funcionais e estruturais das isoformas angiogênicas e antiangiogênicas do VEGF-A têm se tornado de grande interesse devido aos seus importantes papéis na saúde e nas doenças. Muitas pesquisas que têm investigado a expressão em tecidos humanos do mRNA VEGF-A_{xxx}b, o qual na maioria deles têm confirmado a sub-regulação em condições como o câncer (prostático, renal e melanoma metastático), retinopatia diabética, síndrome de Denys Drash e oclusão da veia retiniana. Por sua vez, tem sido mostrado que o VEGF-A165b se encontra supra-regulado na esclerose sistêmica e na asma (BATES *et al.*, 2013). O grupo de Rennel e colaboradores (2008) mostrou ainda que tumores que expressam VEGF165 crescem mais rapidamente do que os tumores que expressam VEGF165b, evidenciando que o VEGF165b não é angiogênico. Revelaram ainda, que tumores nos quais as células expressavam VEGF165b quando misturadas com células que expressavam VEGF165 cresciam mais lentamente do que os que continham células expressando apenas o VEGF165; porém mais rapidamente do que os tumores os quais as células expressavam apenas VEGF165b. Com isso, os autores então descartaram a possibilidade de que o VEGF165b poderia ser angiogênico na presença do VEGF165 (RENNEL *et al.*, 2008).

Os resultados de Rennel e colaboradores (2008) indicaram que existe uma troca da expressão do VEGF admitindo que as isoformas pró-angiogênicas VEGF_{xxx} dominem no carcinoma de próstata e no carcinoma renal, permitindo que os tumores desenvolvessem seus próprios suprimentos sanguíneos. O fenótipo vascular, tanto na angiogênese patológica quanto na fisiológica, pode depender do balanço das isoformas do VEGF.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem o propósito de detectar a expressão imunoistoquímica do VEGF165 (angiogênico) e do VEGF165b (antiangiogênico) em uma série de casos de líquen plano e pênfigo vulgar, comparando as imunomarcações de cada anticorpo entre as lesões com o intuito de colaborar para o entendimento desses imunomarcadores na patogênese, avaliando a participação da angiogênese nas lesões orais desenvolvidas por essas doenças.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (protocolo n. 2.155.965), de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012) (Anexo).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo caracterizou-se como uma pesquisa descritiva, comparativa e retrospectiva constituída pela observação, análise e registro da expressão imunoistoquímica, a partir da apreciação quantitativa e qualitativa dos vasos sanguíneos e células endoteliais isoladas imunomarcados pelos anticorpos VEGF angiogênico e VEGF antiangiogênico em uma série de casos de líquen plano oral e pênfigo vulgar previamente selecionados.

4.3 POPULAÇÃO

Do total de casos registrados e diagnosticados nos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) foram selecionados todos os casos de líquen plano oral (reticular e erosivo), de pênfigo vulgar e alguns casos de hiperplasia fibrosa (HF).

4.4 AMOSTRA

A amostra foi intencional, já que foram selecionados todos os casos diagnosticados como LPO e PV, arquivados no serviço anteriormente referenciado, de acordo com a quantidade e a qualidade do material disponível nos blocos de parafinas existentes, que deveriam ser suficientes para o estudo morfológico e imunoistoquímico. Neste estudo foram incluídos 92 espécimes teciduais orais, sendo selecionados 69 casos de LPO, dos quais 46 foram classificados como reticulares e 23 casos eram lesões erosivas, além de 12 casos de PV e 11 espécimes de hiperplasia fibrosa.

4.4.1 Critérios para Seleção da Amostra

4.4.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra:

- Casos cujos blocos em parafina apresentaram quantidade suficiente de material para realização do estudo imunoistoquímico;
- Casos (pelo menos os de LPO) cujas fichas apresentaram os dados necessários para a realização do estudo clínico.

4.4.1.2 Critérios de Exclusão Foram

excluídos na amostra:

- Casos cujos blocos em parafina não apresentaram quantidade suficiente de material para realização do estudo imunoistoquímico;
- Casos (pelo menos os de LPO) cujas fichas não apresentaram os dados necessários para a realização do estudo clínico.

4.5 ESTUDO CLÍNICO E MORFOLÓGICO

A partir de fichas clínicas de requisições de biópsias arquivadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Odontologia da UFRN, foram obtidas as características clínicas sobre o tipo das lesões (líquen plano reticular e erosivo), além da idade, sexo e localização das mesmas.

As lesões de LPO foram consideradas reticulares quando eram descritas nas fichas clínicas dos pacientes como: assintomáticas, com linhas brancas entrelaçadas ou como pápulas; e as erosivas como: lesões eritematosas, ulceradas e sintomáticas (apresentando dor e/ou ardor), conforme Neville *et al.*, (2016).

4.6 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Os espécimes fixados em formol a 10% e emblocados em parafina foram submetidos a cortes histológicos de 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro, previamente limpas e desengorduradas, preparadas com adesivo à base de Organosilano (3-aminopropyltriethoxy-silano, Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA). Na técnica imunoistoquímica foi empregado o complexo Avidina biotina (Kit LSAB + HRP, DAKO CYTOMATION, Carpinteria, CA, USA), utilizando os imunomarcadores anti-VEGF165 e anti-VEGF165b, seguindo os seguintes passos laboratoriais descritos abaixo:

- Xilol I (30 minutos), estufa 59°C – Desparafinização;
- Xilol II (20 minutos), temperatura ambiente (TA) – Desparafinização;
- Etanol absoluto, I, II e III (05 minutos cada) – TA;
- Etanol 95° (5 minutos) – TA;
- Etanol 80° (5 minutos) – TA;
- Remoção de pigmento formólico com hidróxido de amônia a 10% em etanol a 95% (10 minutos) – TA;
- Lavagem das lâminas em água corrente (10 minutos);
- Passagem dupla em água destilada (5 minutos cada);
- Recuperação antigênica (Quadro 1);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagem dupla em água destilada (5 minutos cada);
- Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 10 volumes (duas trocas 15 minutos cada);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagem dupla em água destilada (5 minutos cada);
- Passagem em TRIS HCl (*Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride*) pH 7,4 (duas trocas de 5 minutos cada);
- Incubação sem solução de BSA (albumina sérica bovina) a 1% e soro fetal bovino (SFB) a 5% em TRIS HCl pH 7,4 por 60 minutos, para bloquear a reação do anticorpo primário com proteínas inespecíficas teciduais;
- Retirar o excesso da solução dos cortes;

- Incubação dos anticorpos conforme a determinação do fabricante (Quadro 1);
- Passagem solução de Tween 20 a 1% em TRIS HCl pH 7,4 (duas trocas de 5 minutos cada);
- Incubação por 15 minutos nos reagentes sequenciais do Kit CSA (*Dako Cytomation Catalyzed Signal Amplification System (CSA)*) para os anticorpos anti-VEGF₁₆₅ e VEGF_{165b};
- Passagem em TRIS HCl pH 7,4 (duas trocas de 5 minutos cada);
- Incubação por 3 minutos em solução de di-aminobenzida (DAB) na concentração de 30 mg em 10 ml de TRIS HCl pH 7,4 ativada por peróxido de hidrogênio 10 volumes para revelação;
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagem dupla em água destilada (5 minutos cada);
- Contracoloração com Hematoxilina de Mayer (10 minutos) – TA;
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagem dupla em água destilada (5 minutos cada);
- Desidratação em etanol em cadeia crescente em 80° ao etanol absoluto (3 minutos cada);
- Diafanização em xilol (3 passagens de 10 minutos);
- Montagem da lâmina em resina *PermOUNT*[®] (*Fischer Scientific*, Fair Lawn, NJ, USA) para observação em microscópio de luz.

4.6.1 Análise do Perfil Imunoistoquímico

As lâminas coradas pela técnica da imunoistoquímica com os anticorpos humanos anti-VEGF₁₆₅ e anti-VEGF_{165b} foram analisadas, com o auxílio de um sistema digital de escaneamento de lâminas (3DHISTECH[®], Budapest, Hungria) e do software Pannoramic Viewer 1.15.2 (3DHISTECH[®], Budapest, Hungria), qualitativa e quantitativamente através da imunopositividade em vasos sanguíneos e em células endoteliais isoladas para os referidos anticorpos. Tecido vascular reativo ou tecido normal foram usados como controle positivo para os marcadores imunoistoquímicos, de acordo com as instruções do fabricante.

A metodologia proposta por Al-Hassiny et al (2018) foi aplicada com finalidade de investigar as diferenças nas expressões dos marcadores vasculares nas regiões selecionadas. Os espécimes foram divididos em três zonas; Zona 1: Superficial (definida como a zona

diretamente abaixo do epitélio, visualizada em um aumento de 200x); Zona 2: Média (definida como a zona abaixo da “superficial”, separada desta por meio campo, visualizada em um aumento de 200x); Zona 3: Profunda (definida como a zona abaixo da zona média e separada desta por meio campo, visualizada em um aumento de 200x). Foram, então, capturadas nove imagens para cada espécime (três da Zona 1, três da Zona 2 e três da Zona 3), sendo a primeira coluna de três imagens de marcação mais significativa, e então, separada lateralmente por um campo (em um aumento de 200x) da segunda e da terceira coluna (Fig.3).

Em seguida, através do aumento de 200x foram quantificado com o auxílio do programa ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*), objetivando evitar a recontagem de estruturas. Desse modo, o resultado foi expresso pelo número médio de vasos em cada zona (média da zona 1, média da zona 2 e média da zona 3) e a o número médio de vasos total (de todas as zonas juntas), para posterior comparação. Durante o procedimento, qualquer célula ou grupo celular endotelial imunomarcado positivamente separados dos microvasos adjacentes e de outros constituintes do tecido conjuntivo, assim como os vasos contendo lúmen, foram considerados como vaso unitário. Foram contados como vasos, ainda, estruturas ramificadas e com descontinuidade na sua conformação.

Baseado na metodologia Wakulich *et al.*, (2002) a intensidade de marcação dos anticorpos utilizados foi avaliada de forma qualitativa, em que um escore de 1 a 3 foi atribuído subjetivamente, em que o escore 1 está relacionada à marcação focal ou fraca; o escore 2 à marcação moderada ou focalmente intensa e o escore 3 à marcação intensa e generalizada (Apêndice).

Quadro 1. Especificação, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Especificidade	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
Anticorpo humano VEGF165 (R&D Systems)	Células epiteliais; fibroblastos, linfócitos e células endoteliais.	1:500	Citrato ph 6.0 Pascal, 30 min	Overnight 4°C
Anticorpo humano VEGF165b (R&D Systems)	Células epiteliais; fibroblastos, linfócitos e células endoteliais.	1:100	Citrato ph 6.0 Pascal, 30 min	Overnight 4°C

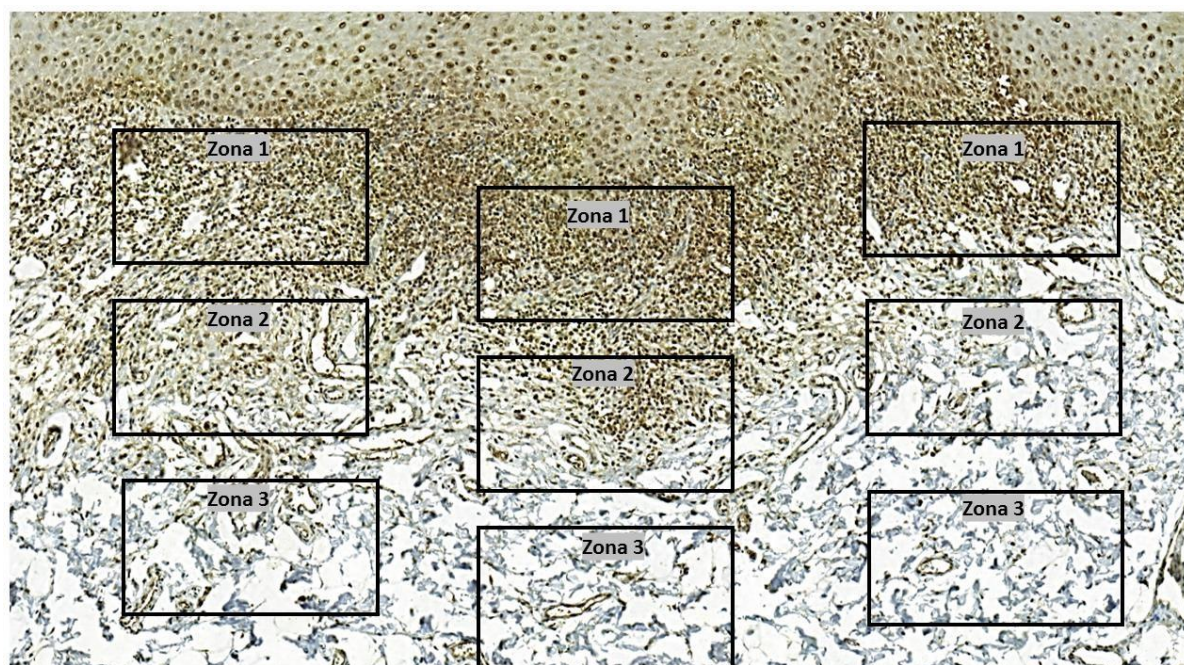


Figura 3: Fotomicrografia de lúquen plano oral (LPO) indicando as regiões definidas como Zonas 1, 2 e 3 nas referidas colunas (PPGPO).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram digitados em planilha eletrônica no programa Excel (*Microsoft Office 2016® for Windows*) (Apêndice) e posteriormente exportados para o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS versão 22; Inc., Chicago, IL, USA), no qual foi inicialmente realizada a análise descritiva dos dados de forma geral e posteriormente a análise entre as lesões.

Assumindo a não normalidade e independência da amostra (categorizadas nos grupos líquen plano oral, pênfigo vulgar e hiperplasia fibrosa), para verificar diferença significativa, fez-se uso dos testes não-paramétricos de *Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney* e o teste de correlação de *Spearman*.

O nível de significância adotado para todos os testes realizados foi de 5%.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS CLÍNICOS

A partir de fichas clínicas de requisições de biópsias arquivadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Odontologia da UFRN, foram obtidas as características clínicas dos pacientes como idade, sexo, cor da pele; além de informações sobre as características clínicas das lesões como localização e o tipo das mesmas para que assim os casos de LPO fossem então classificados como LPO Reticular ou LPO Erosivo.

Dentre todos os casos estudados, o sexo feminino (67,5%), a cor branca (63,1%, sendo 15 casos com ausência dessa informação) e a localização em mucosa jugal (53,8%) foram as características clínicas mais frequentes, com uma média de idade de 48,17 anos. As frequências para cada lesão estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Sexo, cor e localização segundo a lesão apresentada.

			Lesão			
			LPOR	LPOE	PV	Total
Sexo	Masculino	n/%	17/21,3	7/8,8	2/2,5	26/32,5
	Feminino	n/%	29/36,3	16/20,0	9/11,3	54/67,5
Cor	Branco	n/%	26/40,0	11/16,9	4/6,2	41/63,0
	Negro	n/%	7/10,8	3/4,6	2/3,1	12/18,5
	Pardo	n/%	6/9,2	3/4,6	3/4,6	12/18,5
Local	Mucosa Jugal	n/%	20/25,0	16/20,0	7/8,8	43/53,8
	Língua	n/%	18/22,5	2/2,5	0/0,0	20/25,0
	Gengiva	n/%	2/2,5	1/1,3	2/2,5	5/6,3
	Fundo de Sulco	n/%	1/1,3	0/0,0	0/0,0	1/1,3
	Lábio	n/%	2/2,5	4/5,0	1/1,3	7/8,8
	Palato	n/%	1/1,3	0/0,0	0/0,0	1/1,3
	Retromolar	n/%	1/1,3	0/0,0	1/1,3	2/2,5
	Rebordo	n/%	1/1,3	0/0,0	0/0,0	1/1,3

LPOR: Líquen Plano Oral Reticular; LPOE: Líquen Plano Erosivo; PV: Pênfigo Vulgar

5.2 RESULTADOS MORFOLÓGICOS

Ao exame histopatológico, os casos de líquen plano oral e pênfigo vulgar, sob microscopia de luz, em cortes de 5µm de espessura, corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina, revelaram para os diagnósticos histológicos as características inerentes às referidas lesões.

Nas lesões de líquen plano analisadas constatou-se a presença de perda de nitidez da camada basal acompanhada pelo intenso infiltrado inflamatório predominantemente linfocítico, disposto em faixa, imediatamente subjacente ao epitélio, além de algumas vezes apresentarem corpos colóides eosinofílicos na interface epitélio/tecido conjuntivo (Corpos de Civatte), cristas epiteliais ausentes, hiperplásicas ou em forma de “dentes de serra”, variações da espessura da camada espinhosa e graus variáveis de orto ou paraceratose.

No que concerne aos espécimes de pênfigo vulgar, pôde-se observar a existência de separação intraepitelial, acima da camada de células basais do epitélio evidenciando-se a presença de acantólise (separação das células da camada espinhosa do epitélio) e a presença de células soltas, de forma arredondada, na camada espinhosa, chamadas de células de Tzanck, além de um infiltrado leve a moderado de células inflamatórias crônicas no tecido conjuntivo.

5.3 RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICOS

Para todas as lesões aqui estudadas (LPO reticular, LPO erosivo e PV), o marcador anti-VEGF165 foi expresso em todos os espécimes no epitélio, nas células inflamatórias e nos vasos sanguíneos. Já para os casos de HF, a marcação do mesmo anticorpo foi observada em menor quantidade e intensidade, no epitélio e nas células endoteliais.

Do mesmo modo, tanto para as lesões de LPO reticular, LPO erosivo, quanto para as de PV, o marcador anti-VEGF165b foi expresso em todos os espécimes no epitélio, nas células inflamatórias e nos vasos sanguíneos, em menor quantidade e intensidade de marcação do que o VEGF165. Bem como para os casos de HF, em que a essa marcação foi bem mais leve e discreta quando comparada com as lesões estudadas.

Para todas as imunomarcações, quando foram comparadas as lesões com o grupo controle (HF) observaram-se diferenças significativas em cada zona avaliada dos espécimes e

nos espécimes em geral (média total VEGF165: $p < 0,0001$ e média total VEGF165b: $p < 0,0001$), sendo as marcações nas lesões bem superiores ao grupo controle (Tabela 2).

Por outro lado, avaliando apenas as lesões, na análise do VEGF165 foi observada diferença significativa na zona 3 (Tabela 2), às custas da diferença entre LPO erosivo e o PV ($p = 0,034$); e LPO reticular e o PV ($p = 0,007$), sendo a marcação nas lesões de LPO reticular e LPO erosivo ($p = 0,638$) semelhantes.

Na análise da marcação do VEGF165b foram observadas diferenças significativas nas zonas 2, 3 e na avaliação total de cada lesão (Tabela 2). Na zona 2 essa diferença foi observada às custas da comparação entre as lesões de LPO reticular e PV ($p = 0,002$). Diferenças das imunomarcações entre as lesões de LPO reticular e LPO erosivo ($p = 0,285$) e LPO erosivo e PV ($p = 0,085$) não foram significativas. Na zona 3 houve diferença significativa das imunomarcações entre LPO erosivo e PV ($p = 0,034$) e LPO reticular e PV ($p = 0,001$), porém não houve diferença significativa entre as lesões de LPO reticular e LPO erosivo ($p = 0,524$). Na análise total das marcações do VEGF165b (sem categorizações por zonas) houve diferença significativa entre as lesões de LPO reticular e PV ($p = 0,012$). No entanto, a comparação entre as lesões de LPO erosivo e PV ($p = 0,099$) e LPO reticular e LPO erosivo ($p = 0,315$) não apresentaram diferenças significativas.

Levando em consideração as médias por zona para o marcador VEGF165, pôde-se observar que a zona 1 (Superficial) foi a que apresentou maior média de marcação nas lesões de LPO reticular (43,91), seguidos pela zona 2 (Média) (29,13) e pela zona 3 (Profunda) (14,30) sucessivamente. Do mesmo modo, as lesões de LPO erosivo também apresentaram maior média de marcação do VEGF165 na zona superficial (40,21), seguida pela zona média (28,18) e então pela zona profunda (14,88). Assim como as lesões de PV, as quais também obtiveram maior média de marcação na zona 1 (68,66), seguido pela zona 2 (37,88) e pela zona 3 (33,69) (Tabela 2).

Já nas médias por zona para o marcador VEGF165b observaram-se resultados semelhantes. A média para a zona superficial em lesões de LPO reticular foi maior (17,21), seguido pelas zonas média (12,34) e pela zona profunda (7,24). Assim como para as lesões de LPO erosivo que também apresentaram maior média para a zona 1 (19,15), seguido pela zona 2 (13,31) e pela zona 3 (8,38); e para as lesões de PV que tiveram as médias na zona 1 de 27,63, na zona 2 de 20,99 e na zona 3 de 11,52 (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação das médias de marcação dos anticorpos VEGF165 e VEGF165b por zonas e nos espécimes das lesões orais de LP e PV em sua totalidade.

Parâmetros	Lesão	Media	Mediana	Q25-75	Ranks	<i>p</i>
Media Z1 VEGF 165	LPOR	43,91	43,33	32,08-53,16	52,05	0,180
	LPOE	40,21	35,00	31,33-50,00	45,35	
	PV	68,66	45,66	34,83-85,74	61,00	
Media Z2 VEGF 165	LPOR	29,13	25,99	18,57-37,41	49,72	0,717
	LPOE	28,18	24,33	17,33-39,33	49,04	
	PV	37,88	32,49	18,00-49,99	55,46	
Media Z3 VEGF 165	LPOR	14,30	11,33	8,66-20,58	44,23	0,026*
	LPOE	14,88	15,00	6,66-21,33	47,04	
	PV	33,69	27,49	11,83-43,41	66,79	
Media Total VEGF 165	LPOR	28,55	25,94	22,16-34,32	49,47	0,209
	LPOE	27,76	25,67	21,44-33,33	47,52	
	PV	46,74	36,50	21,27-52,30	62,04	
Media Z1 VEGF 165B	LPOR	17,21	15,83	8,00-22,41	45,46	0,156
	LPOE	19,15	20,66	8,00-28,33	52,91	
	PV	27,63	19,33	14,91-43,74	60,71	
Media Z2 VEGF 165B	LPOR	12,34	8,49	5,24-15,74	43,85	0,011*
	LPOE	13,31	14,33	5,66-19,33	51,17	
	PV	20,99	16,66	14,16-31,49	69,38	
Media Z3 VEGF 165B	LPOR	7,24	5,33	3,00-8,16	43,10	0,007*
	LPOE	8,38	5,66	3,33-10,00	47,76	
	PV	11,52	9,83	6,74-16,74	70,33	
Media Total VEGF 165B	LPOR	12,22	11,11	6,80-15,16	45,11	0,037*
	LPOE	13,63	15,22	5,89-17,89	51,76	
	PV	20,05	16,56	11,69-31,17	66,46	

Z: Zona; LPOR: Líquen Plano Oral Reticular; LPOE: Líquen Plano Erosivo; PV: Pênfigo Vulgar; HF: Hiperplasia Fibrosa; Q25-75: Quartis 25 e 75; Ranks: Postos da média; *: Diferença estatística significativa pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 3: Intensidade de marcação dos anticorpos VEGF165 e VEGF165b nas lesões orais de LP e PV.

			Lesão			
			LPOR	LPOE	PV	Total
IM VEGF 165	Leve	n/%	4/4,9	2/2,5	0/0,0	6/7,4
	Moderado	n/%	11/13,6	11/13,6	5/6,2	27/33,3
	Intensa	n/%	31/38,3	10/12,3	7/8,6	48/59,3
IM VEGF 165B	Leve	n/%	23/28,4	11/13,6	6/7,4	40/49,4
	Moderada	n/%	16/19,8	7/8,6	4/4,9	27/33,3
	Intensa	n/%	7/8,6	5/6,2	2/2,5	14/17,3

IM: Intensidade de marcação; LPOR: Líquen Plano Oral Reticular; LPOE: Líquen Plano Erosivo; PV: Pênfigo Vulgar.

Na comparação por zonas, levando em consideração ambos os marcadores, na mesma lesão foi observado que nas lesões de LPO reticular na zona 1 houve uma correlação positiva fraca ($\rho(r\hat{o})=0,163$), mas não significativa ($p=0,279$) entre o anti-VEGF165 e o anti-VEGF165b. Na zona 2 essa correlação foi positiva fraca ($\rho=0,384$) e significativa ($p=0,008$). Assim como na zona 3, onde a correlação foi positiva, fraca ($\rho=0,303$) e significativa ($p=0,041$). Já na avaliação do total, essa correlação positiva fraca ($\rho=0,268$) permaneceu, mas não significativa ($p=0,072$).

Na avaliação do LPO erosivo foi observado na zona 1 uma correlação positiva fraca ($\rho=0,353$) e significativa ($p=0,049$) entre o anti-VEGF165 e o anti-VEGF165b. Na zona 2 essa correlação foi positiva fraca ($\rho=0,147$) e não significativa ($p=0,504$). E na zona 3 a correlação foi positiva fraca ($\rho=0,147$) e não significativa ($p=0,502$). Na avaliação do total essa correlação positiva fraca ($\rho=0,208$) permaneceu, mas não significativa ($p=0,340$).

Na análise dos casos de PV foi observado na zona 1 uma correlação positiva fraca ($\rho=0,379$), mas não significativa ($p=0,224$) entre o anti-VEGF165 e o VEGF165b. Na zona 2 essa correlação foi positiva fraca ($\rho=0,382$) e não significativa ($p=0,220$). Já na zona 3 a correlação foi positiva fraca ($\rho=0,147$) e não significativa ($p=0,649$). Na avaliação do total essa correlação positiva fraca ($\rho=0,294$) permaneceu, mas não significativa ($p=0,354$).

Com relação à intensidade de marcação do anti-VEGF165, observou-se que a maioria das lesões de LPO reticular (67,4%) e PV (58,3%) obtiveram marcações intensas. Enquanto que a maior parte das lesões de LPO erosivo (47,8%) apresentaram intensidade moderada de marcação, como observado na tabela 3. Por outro lado, quando se analisou a intensidade de

marcação do anti-VEGF165b constatou-se que todas as lesões estudadas apresentaram, em sua maioria, intensidade de marcação leve, como observado em 50% dos casos de LPO reticular, 47,8% dos casos de LPO erosivo e em 50% dos casos de PV (Tabela 3).

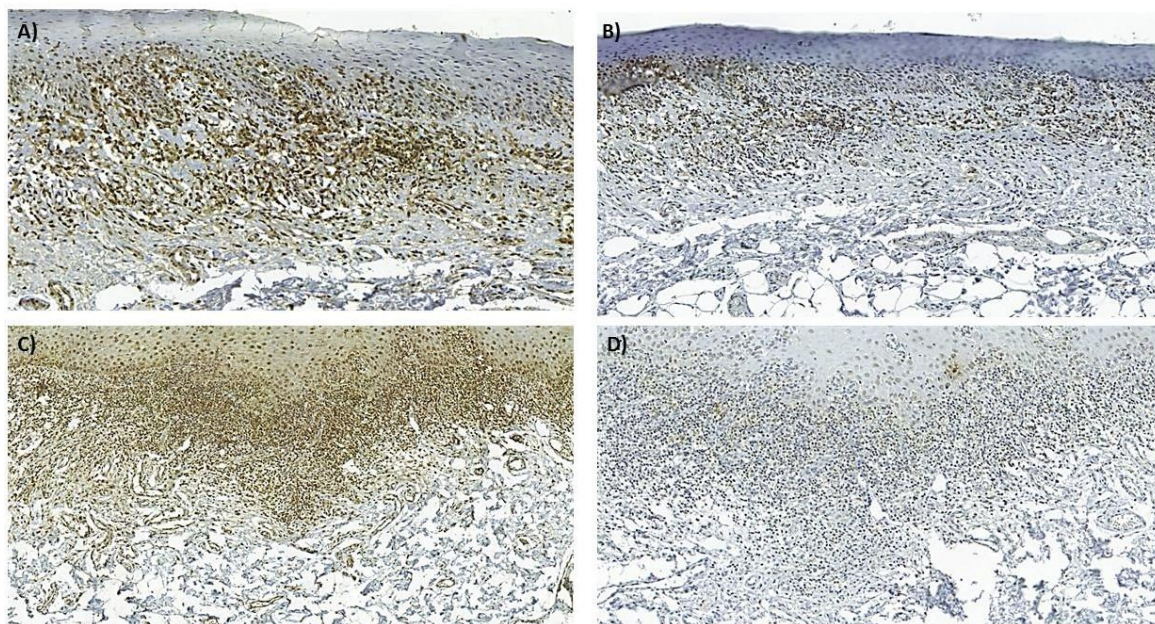


Figura 4: Fotomicrografias LPO Reticular. A e C) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165. B e D) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165b (LSAB, 100X) (PPGO).

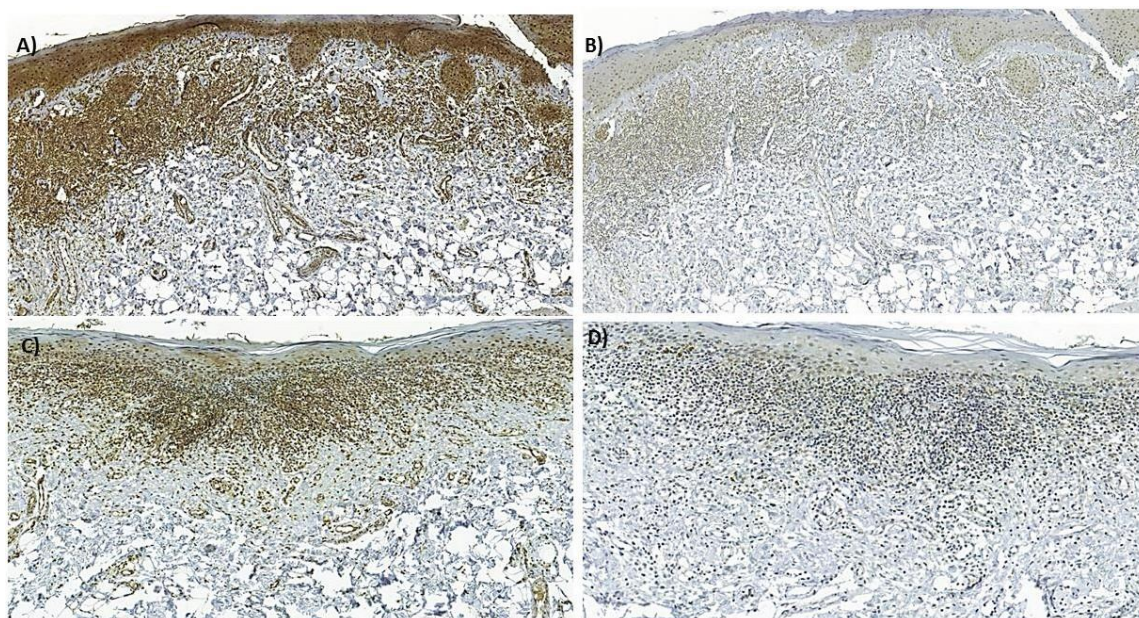


Figura 5: Fotomicrografias LPO Erosivo. A e C) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165. B e D) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165b (LSAB, 100X) (PPGO).

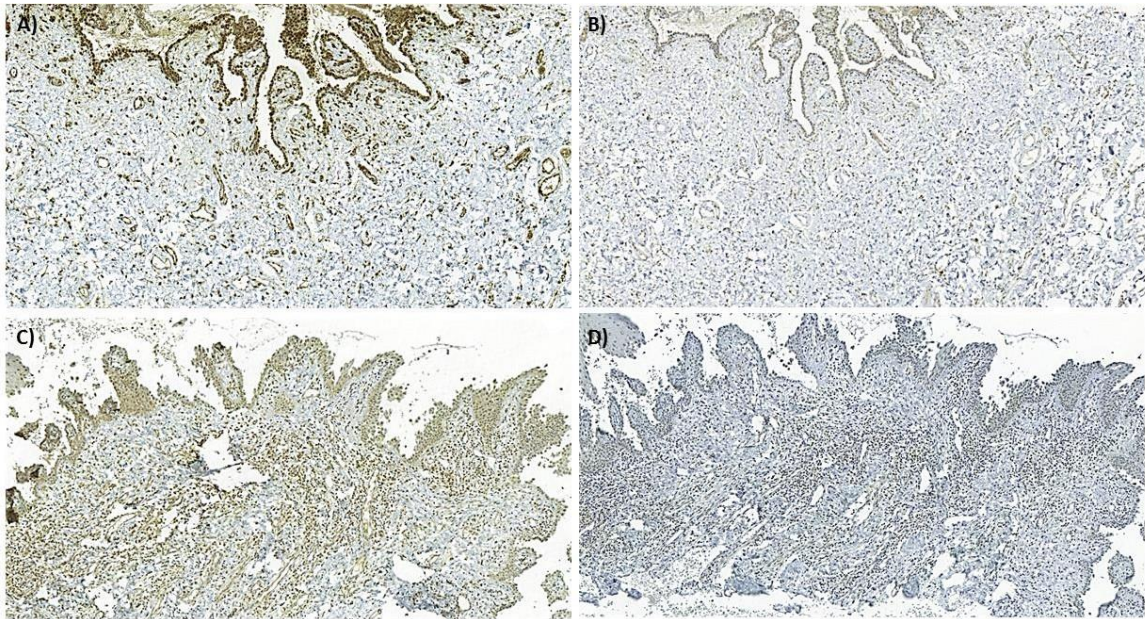


Figura 6: Fotomicrografia Pênfigo Vulgar. A e C) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165. B e D) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165b (LSAB, 100X) (PPGO).

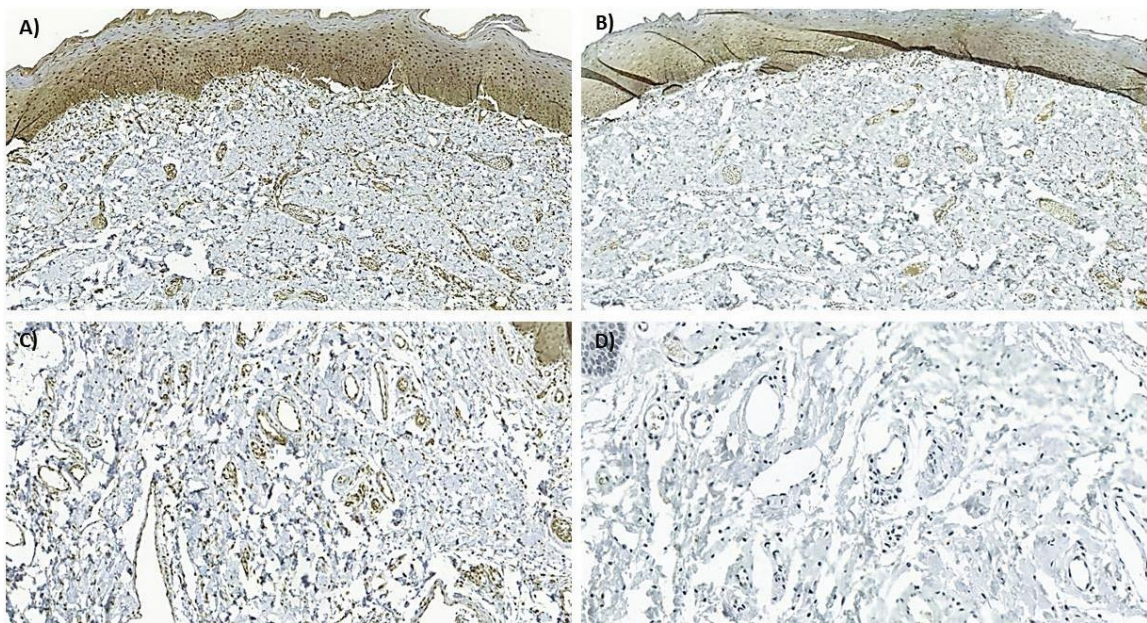


Figura 7: Fotomicrografia Hiperplasia Fibrosa. A e C) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165. B e D) Imunoexpressão do anticorpo anti-VEGF165b (LSAB, 100X) (PPGO).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As características funcionais e estruturais das isoformas angiogênicas e anti-angiogênicas do VEGF-A têm se tornado de grande interesse devido aos seus importantes papéis na saúde e nas doenças. VEGF165b tem mostrado inibir o crescimento e a proliferação das células endoteliais *in vitro*, a angiogênese tumoral e a angiogênese não relacionada a tumor (BATES et al., 2002; KONOPATSKAYA et al., 2006). Muitas pesquisas investigaram a expressão em tecidos humanos do mRNA VEGF-A_{xxx}b, o qual na maioria delas foi confirmada a sub-regulação em condições como o câncer (prostático, renal e melanoma metastático), retinopatia diabética, síndrome de Denys Drash e oclusão da veia retiniana. Por sua vez, tem sido mostrado que o VEGF-A165b se encontra supra-regulado na esclerose sistêmica e na asma (BATES et al., 2013).

O LPO caracteriza-se por uma ciclicidade, com fases de remissão e recrudescência, desse modo, modificações na microcirculação local podem ser associadas a uma maior ou menor intensidade do fenômeno flogógeno e, por conseguinte, a uma maior ou menor atividade da doença. Dados da literatura indicam que, na presença da LPO, os vasos sanguíneos encontram-se dilatados, portanto eles ocupam um espaço relativamente maior, todavia isso não corresponde a um aumento do número dos mesmos (SCARDINA *et al.*, 2007).

Uma relação de *feedback* positivo, em que um estado inflamatório promove a angiogênese e essa facilita a inflamação crônica foi observada em doenças crônicas inflamatórias (CREAMER *et al.*, 2002). Por esse motivo é necessário elucidar o papel da angiogênese na patogênese da LPO a fim de se melhor compreender o seu mecanismo para que sejam desenvolvidas novas estratégias de tratamento (TAO *et al.*, 2007).

Cunha et al. (2004) e Lee (2011) observaram, em seus respectivos casos clínicos relatados, uma significativa remissão das lesões de pênfigo vulgar após o uso oral da talidomida, sendo notado também o retorno das mesmas quando o uso desse medicamento era interrompido. Sugerindo que existe angiogênese nas lesões de PV e que a mesma pode ter um papel importante na manutenção dessas lesões.

Para ambos os anticorpos (VEGF165 e VEGF165b) foram evidenciadas marcações citoplasmáticas dos ceratinócitos nas camadas basal e parabasal. Enquanto que no tecido

conjuntivo foram observadas imunomarcações citoplasmáticas e de membrana nas células endoteliais, foco dessa pesquisa.

O fato de terem sido observadas diferenças no VEGF165 no LPO quando comparado com as HF pode ser usado para destacar fatores específicos envolvidos na patogênese do LPO ao invés de serem destacadas alterações que também podem ser observadas em outros tipos de inflamação crônica. Diferenças na expressão do marcador vascular angiogênico entre LPO e HF não foram inesperadas devido a diferenças na composição do infiltrado inflamatório e na regulação do sistema imune e vias de sinalização (FIRTH *et al.*, 2015; SINON *et al.*, 2016).

O estresse do retículo endoplasmático levando ao desdobramento de uma proteína promove uma resposta que pode modular a angiogênese via condução da transcrição do VEGFA, poderia ser uma maneira pela qual explicar-se-ia a relação da angiogênese com o LPO (GOSH *et al.*, 2010; BINET *et al.*, 2015). Outro fator contribuinte para essa relação é a supra-regulação das moléculas de adesão das células endoteliais no LPO pelo fator de necrose tumoral (TNF- α). As moléculas de adesão vasculares (VCAM1 e ICAM1) que permitem a interação entre as células endoteliais e os linfócitos têm sido evidenciadas estarem expressas mais significativamente em LPO quando comparados com mucosa oral normal, influenciando potencialmente a migração dos linfócitos dos vasos sanguíneos para o microambiente local (SEYEDMAJIDI *et al.*, 2013). Uma das fontes do TNF- α são os mastócitos, presentes em densidade aumentada em lesões de LPO e situados em sua maioria em região subepitelial e próximos a vasos sanguíneos. A degranulação dos mastócitos é um evento significativo na patogênese do LPO estimulando os vasos sanguíneos para a liberação dos linfócitos e de quimiocinas que ativam as células T (SHARMA *et al.*, 2011).

Os achados desse estudo, no qual se observa expressão significativamente maior do VEGF no LPO em comparação com a HF corroboram com outros trabalhos prévios os quais apresentaram resultados semelhantes ao comparar as lesões de LPO com o grupo controle (TAO *et al.*, 2007; AL-HASSINY *et al.*, 2018). Do mesmo modo, Mittal e colaboradores (2012), obtiveram resultados similares usando outro marcador de angiogênese, o anti-CD34, onde a microdensidade vascular nas lesões de LPO reticular e erosivo foi significativamente maior do que no grupo controle.

Resultados similares, foram evidenciados, na marcação do anticorpo antiangiogênico VEGF165b quando se comparou as lesões de LPO - reticular e erosivo – e de PV com o grupo

controle. Sendo as imunomarcações nas lesões bem superiores do que nos casos selecionados de HF.

No presente estudo, foi observado que a média de marcação para o VEGF angiogênico foi maior nas regiões mais superficiais do tecido conjuntivo no LPO reticular, no erosivo, no PV e na HF. Ao contrário do que foi observado no estudo de Al-Hassiny e colaboradores (2018) - no que se refere ao LPO - o qual mostrou que a porcentagem de células marcadas para o VEGF e para o CD34 foi significativamente maior nas regiões mais profundas tanto no LPO quanto no seu grupo controle.

A mesma observação é verdadeira quando se analisa a marcação do VEGF165b, por zona, onde a média de marcação para este marcador antiangiogênico também foi maior nas zonas mais superficiais das lesões, seguido pelas zonas média e profunda.

Além disso, estudando as médias das marcações de cada lesão, pôde-se perceber que quando se compara ambos os marcadores anti-VEGF165 e anti-VEGF165b, juntos por zonas, observa-se uma correlação positiva fraca e não significativa em todas as zonas das lesões de PV. Já para as lesões de LPO, observa-se uma correlação positiva fraca e significativa na zona média ($p=0,008$) e na zona profunda ($p=0,041$) nas lesões de LPO reticular e na zona superficial do LPO erosivo ($p=0,049$). Afirmando que quando o anti-VEGF165 apresenta um aumento na sua marcação o anti-VEGF165b obrigatoriamente também mostrará esse aumento, e virse e versa.

Nos estudos de Tao e colaboradores (2007) e Nóbrega (2013), não foram observadas diferenças significantes das marcações do VEGF e do CD34, respectivamente, entre o LPO erosivo e o reticular, embora em ambos os estudos a microdensidade média e a contagem microvascular dos vasos tenha sido maior no primeiro grupo. Esses resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho, onde pôde-se verificar que em quaisquer zonas das lesões de LPO reticular e LPO erosivo não houve diferença significativa na marcação do anti-VEGF165. O contrário do que foi observado no estudo de Mittal e colaboradores (2012), onde foi evidenciado o aumento da microdensidade vascular nos casos de LPO erosivo quando comparado com os casos de LPO reticular, sugerindo que essa diferença significativa possa representar um dos fatores que contribuem para o possível potencial de malignidade nas lesões erosivas, uma vez que essas lesões deixam a mucosa com uma maior predisposição para sofrer danos por agentes carcinogênicos.

Diferenças significativas foram observadas em nosso trabalho nas marcações do anti-VEGF165 nas zonas mais profundas do tecido conjuntivo quando se comparou as lesões de LPO reticular e PV; e as lesões de LPO erosivo e PV. Sendo essas marcações mais significativas nas lesões de PV do que em ambas do LPO, sugerindo que um microambiente angiogênico estava mais exuberante nas lesões do PV do que nas de LPO. Esse resultado não concorda os resultados de Nóbrega (2013), que observou diferença significativa de marcação angiogênica pelo CD34 entre as lesões de LPO (erosivo e reticular) e o PV. E ainda que não tenha sido significativa, foi notado um leve aumento de marcação para as lesões de LPO.

Atualmente, existem estudos na literatura onde se discute e relaciona a angiogênese com a patogênese e manutenção nas lesões de LPO, entretanto essa discussão ainda não tem sido explorada em lesões de PV. Miyamoto e colaboradores (2017; 2018) analisaram níveis séricos de VEGF em pacientes de pênfigo - principalmente o pênfigo foliáceo - e o pênfigo vulgar, sendo essas avaliações em tecidos que ainda não sofreram o dano tecidual (eritrodermia) causado por essa doença. E é observado que existe um aumento nos níveis séricos do VEGF nos pacientes de PV, mas que também há um aumento da endogлина, molécula que além de induzir a angiogênese, induz a repitelização que pode potencialmente prevenir o desenvolvimento da eritrodermia nesses pacientes. Portanto, avaliando e comparando esses trabalhos da literatura com o presente estudo, pode-se considerar que existe um microambiente angiogênico nas lesões de PV e que a angiogênese pode ter algum papel na manutenção das lesões do PV, assim como existe nas lesões do pênfigo foliáceo (MIYAMOTO *et al.*, 2018). Contudo, mais trabalhos envolvendo a análise da angiogênese nas lesões propriamente ditas do PV, como foi realizado nessa pesquisa, serão necessárias para confirmar essa conclusão.

Todavia, nos casos das marcações para o anticorpo antiangiogênico VEGF165b, diferenças significativas foram observadas nas zonas médias entre o LPO reticular e PV; nas zonas profundas, novamente entre as lesões de LPO reticular e PV e entre LPO erosivo e PV. Além disso, também foram observadas diferenças significativas entre as lesões de LPO reticular e PV, mesmo quando não se categorizaram as lesões por zonas. Sendo essas marcações mais significativas nas lesões de PV do que em ambas do LPO. Esses resultados foram similares aos encontrados para o marcador angiogênico anti-VEGF165, contrariando o que se esperava previamente, uma vez que se tratam de anticorpos que registram eventos opostos.

A expressão do VEGF é regulada pela endoglinta, um marcador de angiogênese e que também está envolvido no processo de cicatrização da pele e mucosas (LIU *et al.*, 2014). A baixa expressão de endoglinta ativa vias intracelulares que inibem a proliferação dos ceratinócitos e reduzem a síntese de óxido nítrico pelas células endoteliais (BIELEFELD *et al.*, 2013; PEREZ-GOMEZ *et al.*, 2014). Portanto, a diminuição da expressão da endoglinta observada no pêfingo foliáceo e na psoríase sugere que os processos de reparo estão mais prejudicados nessas doenças do que no PV, onde essa diminuição da endoglinta não foi observada (MIYAMOTO *et al.*, 2018). Um desequilíbrio na expressão do VEGF leva a uma vasodilatação e um aumento na permeabilidade vascular para as células inflamatórias, possibilitando a perpetuação do dano tecidual na psoríase e no pêfingo foliáceo (BAE *et al.*, 2015).

No PV, a produção de IgG contra as desmogleínas 1 e 3 – glicoproteínas desmossomais – levam a ruptura das pontes intercelulares, provocando a formação de fendas intraepiteliais (AOKI *et al.*, 2015). Danos na mucosa oral ativam vias fisiológicas que superegulam a secreção de VEGF e da endoglinta, a fim de permitir a reparação tecidual (WISE *et al.*, 2012). O VEGF é preferencialmente expresso por células endoteliais e por ceratinócitos na mucosa oral normal (KUMAR *et al.*, 2009). Igualmente, uma discreta expressão de VEGF no epitélio e nos vasos sanguíneos foi observada na HF deste estudo.

Nóbrega (2013), não observou diferença significativa na contagem microvascular da angiogênese entre as lesões de PV com o grupo controle. Por outro lado, no estudo de Miyamoto e colaboradores (2018), foi observado um aumento significativo do nível sérico de VEGF em pacientes com PV, quando comparados com pacientes saudáveis. Corroborando com nosso estudo, à nível imunoistoquímico, uma vez que podemos observar que a intensidade de marcação bem como a quantidade de vasos sanguíneos e células endoteliais isoladas marcados foram significativamente superiores nas lesões de PV quando comparado ao grupo controle (HF), como já citado previamente nessa discussão. Demonstrando, desse modo, que existe um microambiente angiogênico nessas lesões. Porém, não podemos afirmar se esse microambiente angiogênico nas lesões de PV contribui da mesma maneira na manutenção das lesões de LPO aqui estudadas.

Uma vez que acontece a ruptura intraepitelial no PV, ceratinócitos, vasos sanguíneos e células inflamatórias se tornam hábeis para aumentar a síntese tanto do VEGF quanto a da

endoglina, sendo que esta última induz a repitelização que pode potencialmente prevenir o desenvolvimento da eritrodermia nesses pacientes (MIYAMOTO *et al.*, 2018).

Como já relatado anteriormente no início dessa discussão, todas as lesões estudadas mostraram marcação positiva para o anticorpo angiogênico VEGF165, sendo que as lesões de LPO reticular e PV mostraram marcação intensa (67,4% e 58,3%) enquanto que as lesões de LPO erosivo, marcação moderada (47,8%). Com relação ao PV, isso pode ser relacionado ao fato de essas lesões também apresentarem uma média de marcação significativamente maior quando comparados com ambos os casos de LPO, nas zonas mais profundas dessas lesões, reforçando que o PV apresenta um microambiente tão ou mais angiogênico do que as lesões de LPO.

Considerando a análise da marcação do anti-VEGF165b todas as lesões apresentaram intensidade de marcação leve (LPO reticular: 50%; LPO erosivo: 47,8%; PV: 50%). Por se tratar de um marcador antiangiogênico esse resultado foi o esperado, principalmente nas lesões do LPO reticular e do PV, uma vez que estas mesmas lesões apresentaram marcações intensas para o marcador angiogênico anti-VEGF165.

O grupo de Rennel e colaboradores (2008) mostrou que tumores nos quais as células expressam VEGF165 crescem mais rapidamente do que os tumores nos quais as células expressam VEGF165b. Revelaram ainda, que tumores nos quais as células expressavam VEGF165b quando misturadas com células que expressavam VEGF165 cresciam mais lentamente do que os que continham células expressando apenas o VEGF165; porém mais rapidamente do que os tumores os quais as células expressavam apenas VEGF165b. Com todos esses achados, os autores descartaram a possibilidade de que o VEGF165b poderia ser angiogênico na presença do VEGF165 (RENNEL *et al.*, 2008). Concluindo que o VEGF165b foi capaz de inibir o crescimento de pelo menos 3 tipos diferentes de tumor (carcinoma de células renais, sarcoma de Ewing e melanoma metastático), e que o mecanismo se dá mais provavelmente às custas da inibição da angiogênese do que por um efeito direto sobre o crescimento das células tumorais.

Pode-se notar através da análise dos resultados da presente pesquisa que ambos os marcadores, VEGF165 e VEGF165b, apresentaram, por vezes, resultados semelhantes. O VEGF165b provavelmente foi expresso nas lesões (LPO e PV) que evidenciaram possuir um microambiente angiogênico, revelando que existe um leve desequilíbrio entre os processos

angiogênicos e antiangiogênicos - diferentemente como o que acontece em lesões neoplásicas, onde a “balança” desequilibra mais consideravelmente para o lado da angiogênese – demonstrando, desse modo que a sinalização antiangiogênica também é importante nessas doenças como observado nas correlações positivas fracas, porém significativas entre os marcadores VEGF165 e VEGF165b nas lesões de LPO dessa pesquisa. Além disso, também se deve levar em consideração que não se pode saber o momento no qual os pacientes removeram as lesões para serem analisadas histopatologicamente e, por se tratarem doenças que apresentam fases de remissão e exacerbação deve-se perceber que esse momento está diretamente relacionado com qual fenótipo vascular essas lesões irão apresentar naquele instante.

Compreender a angiogênese no LPO e como isso se relaciona com sua patogênese é importante para obter um maior entendimento da sua causa e progressão, bem como auxiliar no manejo dessa doença pelos clínicos. Em conjunto com as evidências de que angiogênese contribui para a patogênese de várias outras condições inflamatórias crônicas imunomediadas, incluindo a artrite reumatóide, doença de Crohn e psoríase (POUSA *et al.*, 2008; HENNO *et al.*, 2009; ELSHABRAWY *et al.*, 2015), o presente estudo contribui para o entendimento de do papel da angiogênese no desenvolvimento e manutenção lesões de LPO e de PV, podendo também ser relacionado como um marcador de atividade de ambas as doenças. Porém, como já revelado anteriormente nessa discussão, não podemos afirmar se esse microambiente angiogênico nas lesões de PV contribui da mesma maneira na manutenção das lesões de LPO aqui estudadas.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados encontrados no presente estudo permitem concluir que:

- Muitos vasos sanguíneos e células endoteliais isoladas expressaram mais significativamente o marcador pró-angiogênico VEGF165 no tecido conjuntivo de líquen plano oral e pênfigo vulgar quando comparado com os casos de hiperplasia fibrosa.
- Os achados encontrados nesta pesquisa, associados aos dados relatados na literatura, sugerem uma possível participação do processo angiogênico na patogênese e manutenção das lesões de líquen plano oral.
- Sugere-se que existe um microambiente angiogênico nas lesões de PV. Porém, não podemos afirmar se esse microambiente angiogênico contribui da mesma maneira na manutenção das lesões de LPO.
- Não houve diferença significativa na marcação do anti-VEGF165 em quaisquer zonas das lesões de LPO reticular e LPO erosivo.
- Diferenças significativas foram observadas nas marcações do anti-VEGF165 nas zonas mais profundas das lesões quando se comparou LPO reticular e PV; e LPO erosivo e PV. Sendo essas marcações mais significativas nas lesões de PV do que em ambas do LPO, sugerindo que um microambiente angiogênico estava mais exuberante nas lesões do PV do que nas de LPO.
- A marcação leve do anticorpo VEGF165b nas lesões (LPO e PV), sugere que existe apenas um leve desequilíbrio entre os processos angiogênicos e antiangiogênicos, refletindo o fenótipo vascular de cada uma dessas doenças, o qual também é influenciado pelo momento da coleta do material de biópsia das referidas lesões.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- ALAIZARI, N.A. et al. Hepatitis C virus infections in oral lichen planus: A systematic review and meta-analysis. **Aust Dent J**, v.61, n.3, p.282-7, 2016.
- AL-HASHIMI, I. et al. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.103, S25e, p.1-12, 2007.
- AL-HASSINY, A. et al. Upregulation of angiogenesis in oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, v.57, n.2, p.173-178, 2018.
- AMEGLIO, F. et al. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris: correlated behaviour of serum VEGF, sE-selectin and TNF-alpha levels. **J Biol Regul Homeost Agents**, v.11, n.4, p.148-53, 1997.
- AMORMINO, S.A.F.; BARBOSA, A.A.M. Pênfigo Vulgar: revisão de literatura e relato de caso. **Revista Periodontia**, v.20, n.2, p.47-52, 2010.
- ANURADHA, C.H. et al. Oral lichen planus: a review. **N Y State Dent J**, v.74, n.4, p. 66-8, 2008.
- AOKI, V.; RIVITTI, E.A.; DIAZ, L.A. Update on fogo selvagem, an endemic form of pemphigus foliaceus. **J Dermatol**, v.42, n.1, p. 18-26, 2015.
- AOYAMA, Y.; NAGAI, M.; KITAJIMA, Y. Binding of pemphigus vulgaris IgG to antigens in desmosome core domains excludes immune complexes rather than directly splitting desmosomes. **Br J Dermatol**, v.162, p.1049-55, 2010.
- ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v.275, n.5302, p.964-7, 1997.
- AU, J.; PATEL, D.; CAMPBELL, J.H. Oral lichen planus. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v.25, n.1, p.93-100, 2013.

BAE, O.N.; NOH, M.; CHUN, Y.J.; JEONG, T.C. Keratinocytic vascular endothelial growth factor as a novel biomarker for pathological skin condition. **Biomol Ther (Seoul)**, v.23, n.1, 2015.

BASCONES-MARTINEZ, A.; GARCIA-GARCIA, V.; MEURMAN, J.H.; REQUENA-CABALLERO, L. Immune-mediated diseases: What can be found in the oral cavity? **Int J Dermatol**, v.54, n.3, p.258-270, 2015.

BATES, D.O. et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. **Cancer Res**, v.62, n.14, p.4123-31, 2002.

BATES, D.O. et al. Detection of VEGF-A(xxx)b isoforms in human tissues. **PLoS One**, v.8, n.7, e68339, 2013.

BIELEFELD, K.A.; AMINI-NIK, S.; ALMAN, B.A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n.12, 2013.

BINET F.; SAPIEHA, P. ER stress and angiogenesis. **Cell Metab**, v.22, n.4, p.560-575, 2015.

BLACK, M.; MIGNOGNA, M.D; SCULLY, C. Number II. Pemphigus Vulgaris. **Oral Dis**, v.11, n.3, p. 119-130, 2005.

BUAJEEB, W.; OKUMA, N.; THANAKUN, S.; LAOTHUMTHUT T. Direct immunofluorescence in oral lichen planus. **J Clin Diagn Res**, v.9, n.8, p.34-37, 2015.

CAMACHO-ALONSO, F.; LÓPEZ-JORNET, P.; BERMEJO-FENOLL, A. Pemphigus vulgaris. A presentation of 14 cases and review of the literature. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.10, n.4, p. 282-8, 2005.

CARROZZO, M.; THORPE, R. Oral lichen planus: a review. **Minerva Stomatol**, v.58, n.10, p.517-37, 2009.

CHENG, Y.S. et al. Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v.122, n.3, p.332-54, 2016.

CLAPP, C. et al., 2009. Peptide hormone regulation of angiogenesis. **Physiol Rev**, v.89, p1117-1215, 2009.

CREAMER, D.; SULLIVAN, D.; BICKNELL, R.; BARKER, J. Angiogenesis in psoriasis. **Angiogenesis**, v.5, n.4, p.231-6, 2002.

CUNHA, P.R. et al. Pemphigus vulgaris with involvement of the cervix treated using thalidomide therapy. **Int J Dermatol**, v.43, n.9, p.682-84, 2004.

D'AMATO, R.J.; LOUGHNAN, M.S.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, n.9, p.4082-4085, 1994.

DE ROSSI, S.S; CIARROCCA, K. Oral lichen planus and lichenoid mucosistis. **Dent Clin North Am**, v.58, n.2, p.299-313, 2014.

DEHGHANIAN, F.; HOJATI, Z. Comparative insight into expression of recombinant human VEGF111b, a newly identified anti-angiogenic isoform, in eukaryotic cell lines. **Gene**, v.553, n.1, p.57-62, 2014.

EBRAHIMI, M.; NYLANDER, K.; VAN DER WAAL, I. Oral lichen planus and p53 family: what do we know? **J Oral Pathol Med**, v.40, n.4, p.281-5, 2010.

ELSHABRAWY, H.A. et al. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Angiogenesis**, v.18, n.4, p.433-448, 2015.

ENDO, H. et al. Early detection and successful management of oral pemphigus vulgaris: a case report, **Periodontol**, v.76, n.1, p.154-60, 2005.

FANG, M.; ZHANG, W.; CHEN, Y.; HE, Z. Malignant transformation of oral lichen planus: A retrospective study of 23 cases. **Quintessence Int**, v.40, p. 235-242, 2009.

FARHI, D.; DUPIN, N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v.28, n.1, p.100-108, 2010.

FIRTH, F.A. et al. Regulation of immune cells in oral lichen planus. **Arch Dermatol Res**, v. 307, n.4, p.333-9, 2015.

FITZPATRICK, S.G.; HIRSCH, S.A.; GORDON, S.C. The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A systematic review. **J Am Dent Assoc**, v.145, n.1, p.45-56, 2014.

FRAGA, C.A.C. et al. High HIF-1 α expression genotypes in oral lichen planus. **Clin Oral Investig**, v.17, n. 9, p.2011-5, 2013.

FRUSIC-ZLOTKIN, M. et al. Apoptotic mechanism in pemphigus autoimmunoglobulins-induced acantholysis – possible involvement of the EGF receptor. **Autoimmunity**, n.39, p.563-75, 2006.

GAMBINO, A. et al. Conservative approach in patients with pemphigus gingival vulgaris: A pilot study of five cases. **Int J Dent**, 2014:747506, 2014.

GIURDANELLA, F.; DIERCKS, G.F.; JONKMAN, M.F.; PAS, HH. Laboratory diagnosis of pemphigus: Direct immunofluorescence remains the gold standard. **Br J Dermatol**, v.175, n.1, p.185-6, 2016.

GORDON, M.S; MENDELSON, D.S.; KATO, G. Tumor angiogenesis and novel antiangiogenic strategies. **Int J Cancer**, v.126, p.1777-87, 2010.

GOROUHI, F.; DAVARI, P.; FAZEL, N. Cutaneous and mucosal lichen planus: A comprehensive review of clinical subtypes, risk factors, diagnosis, and prognosis. **Scientific World Journal**, p.1-22, 2014.

GU, F. et al. VEGF111b, a new member of VEGFxxx_b isoforms and induced by mitomycin C, inhibits angiogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.441, n. 1, p.18-24, 2013.

HARMAN, K.E. et al. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. **Br J Dermatol**, v.144, n.4, p.775-80, 2001.

HARPER, S.J.; BATES, D.O. et al. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? **Nat Rev Cancer**, v.8, n.11, p.880-7, 2008.

HARRIS, S. et al. Do Anti-Angiogenic VEGF (VEGFxxx_b) Isoforms Exist? A cautionary tale. **PLoS One**, v.7, n.5, e:35231, 2012.

HENNO, A. et al. Altered expression of angiogenesis and lymphangiogenesis markers in the uninvolved skin of plaque-type psoriasis. **Br J Dermatol**, v.160, n.3, p.581-590, 2009.

INGEN-HOUSZ-ORO, S. et al. First-line treatment of pemphigus vulgaris with a combination of rituximab and high-potency topical corticosteroids. **JAMA Dermatol**, v.151, n.2, p.200-203, 2015.

ISHII, K. et al. Development of pemphigus vulgaris in a patient with pemphigus foliaceus: antidesmoglein antibody profile shift confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay. **J Am Acad Dermatol**, v.42, n.5 (pt.2), p.859-61, 2000.

ISMAIL, S.B; KUMAR, S.K; ZAIN, R.B. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. **J Oral Sci**, v.49, n.2, p.89-106, 2007.

JOLLY, P.S. et al. p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus vulgaris acanthoysis. **J Biol Chem**, v.285, n.19, p.8936-41, 2010.

KALMAR, J.R. Diagnosis and management of oral lichen planus. **J Calif Dent Assoc**, v.35, n.6, p. 405-11, 2007.

KAWAMURA, H. et al. Neuropilin-1 in regulation of VEGF-induced activation of p38MAPK and endothelial cell organization. **Blood**, v.112, n.9, p.3638-9, 2008.

KAWAMURA, H. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. **Cancer Res**, v.68, n.12, p.4683-92, 2008.

KERSHENOVICH, R.; HODAK, E.; MIMOUNI, D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. **Autoimmun Rev**, v.13, n.4-5, p.477-481, 2014.

KONOPATSKAYA, O. et al. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. **Mol Vis**, n.12, p.626-32, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Bases Patológicas da Doenças**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2005. p.1592.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. **Cell Death Differ**, v.16, p.3-11, 2009.

LANZA, A.; CIRILLO, N.; FEMIANO, F.; GOMBOS, F. How does acantholysis occur in pemphigus vulgaris: A critical review. **J Cutan Pathol**, v.33, n.6, p.401-412, 2006.

LEE, F.C. Longterm clinical remission of oral and cutaneous pemphigus with thalidomide. **Int J Dermatol**, v.50, n.9, p.1120-3, 2011.

LIU, Z. et al. ENDOGLIN is dispensable for vasculogenesis, but required for vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. **PLoS One**, v.9, n.1, p.e86273, 2014.

MADALA, J.; BASHAMALLA, R.; KUMAR, M.P. Current concepts of pemphigus with a deep insight into its molecular aspects. **J Oral Maxillofac Pathol**, v.21, n.2, p.260-263, 2017.

MARCHENKO, S. et al. Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: A missing link in disease pathophysiology. **J Biol Chem**, v.285, p.3695-704, 2010.

MARTIN, L.K. et al. Interventions for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. **Cochrane Database Syst Rev**, v.21, n.1, CD006263, 2009.

MATTHEWS, S.J.; MCCOY, C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. **Clin Ther**, v.25, n.2, p.342-95, 2003.

MCMILLAN, R.; TAYLOR, J.; SHEPHARD, M. et al. World Workshop on Oral Medicine VI: A systematic review of the treatment of mucocutaneous pemphigus vulgaris. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v.120, n.2, p.132-142.e161, 2015.

MITTAL, N.; SHANKARI G.S, M.; PALASKAR, S. Role of angiogenesis in the pathogenesis of oral lichen planus. **J Oral Maxillofac Pathol**, v.16, p.45-48, 2012.

MIROWSKI, G.W.; SCHLOSSER, B.J. Oral lichen planus: Pathogenesis, clinical features and diagnosis. 2017. **UpToDate**.www.uptodate.com/contents/oral-lichen-planus-pathogenesis-clinicalfeatures-and-diagnosis. Acesso em: 26 maio 2018.

MIYAMOTO, D. et al. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in pemphigus foliaceus patients with erythroderma. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.31, n.2, p.333-336, 2017.

MIYAMOTO, D. et al. Exploring the *in situ* expression of vascular endothelial growth factor and endoglin in pemphigus foliaceus variants and pemphigus vulgaris. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, 2018. Epub ahead of print.

NEVILLE, B.W. et al. **Oral &Maxillofacial Pathology**. 4nd ed. WB Saunders: Philadelphia; 2016.

NIKITENKO. L.L. Vascular endothelium in cancer. **Cell Tissue Res**. v. 335, p. 235-40, 2009.

NÓBREGA, Luciana Eloísa da S. Castro. *Avaliação da angiogênese em lesões de líquen plano oral e pênfigo vulgar*. 2013. 90f. Dissertação (Mestrado em Patologia Oral) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN.

O'NEILL, I.D.; SCULLY, C. Biologics in oral medicine: Ulcerative Disorders. **Oral Dis**, v.19, n.1, p.37-45, 2013.

PARASHAR, P. Oral lichen planus. **Otolaryngol Cin North Am**, v.44, n.1, p.89-107, 2011.

PATEL, S.; KUMAR, S.; LAUDENBACH, J.M.; TERUEL, A. Mucocutaneous Diseases: Oral Lichen Planus, Mucous Membrane Pemphigoid and Pemphigus Vulgaris. **J Calif Dent Assoc**, v.44, n.9, p.561-70, 2016.

PEREZ-GOMEZ, E.et al. Impaired wound repair in adult endoglin heterozygous mice associated with lower NO bioavailability. **J Invest Dermatol**, v.134, n.1, 2014.

PIGATTI, F.M.; TAVEIRA, L.A.; SOARES, C.T. Immunohistochemical expression of Bcl-2 and Ki-67 in oral lichen planus and leukoplakia with different degrees of dysplasia. **Int J Dermatol**, v.54, n.2, p.150-5, 2015.

POUSA ID, MATE J, GISBERT JP. Angiogenesis in inflammatory bowel disease. **Eur J Clin Invest**. v.38, n.2, p.73-81, 2008.

RAMALINGAM, S. et al. Role of Mast Cells in Oral Lichen Planus and Oral Lichenoid Reactions. **Autoimmune Dis**, Jan17, 2018.

RENNEL, E. et al. The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. **Br J Cancer**, v.98, n.7, p.1250-7, 2008.

ROOPASHREE, M.R. et al. Pathogenesis of oral lichen planus – a review. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.38, p.729–34, 2010.

SALGADO, D.S. et al. Plaque control improves the painful symptoms of oral lichen planus gingival lesions. A short-term study. **J Oral Pathol Med**, v.42, n.10, p.728-732, 2013.

SCARDINA, G.A.; PICONE, V.; CACIOPPO, A.; MESSINA, P. Study of microcirculation in oral lichen planus by video-capillaroscopy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.103, p.e30-4, 2007.

SCARDINA, G.A.; RUGGIERI, A.; MESSINA, P.; MARESI, E. Angiogenesis of oral lichen planus: a possible pathogenic mechanism. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.14, n.11, p.e558-62, 2009.

SCHMIDT, E.; WASCHKE, J. Apoptosis in pemphigus. **Autoimmun Rev**, n.8, p.533-7, 2009.

SCULLY, C.; CHALLACOMBE, S.J. Pemphigus vulgaris: update on etiopathogenesis, oral manifestations and management. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.13, n.5, p.397-408, 2002.

SEYEDMAJIDI, M.; SHAFARAE, S.; BIJANI, A.; BAGHERI, S. VCAM1 and ICAM1 expression in oral lichen planus. **Int J Mol Cell Med**, v.2, n.1, p.34-40, 2013.

SHARMA, R.; SIRCAR, K.; SINGH, S.; RASTOGI, V. Role of mast cells in pathogenesis of oral lichen planus. **J Oral Maxillofac Pathol**, v.15, n.3, p. 267-71, 2011.

SINON, S.H. et al. Downregulation of toll-like receptor-mediated signalling pathways in oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, v.45, n.1, p.28-34, 2016.

- SPINDLER, V. et al. Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. **J Biol Chem**, v.284, p.30556-64, 2009.
- STOOPLER, E.T.; SOLLECITO, T.P. Oral mucosal diseases: Evaluation and management. **Med Clin North Am**, v.98, n.6, p.1323-1352, 2014.
- STONE, S.J. et al. Cost-effectiveness of personalized plaque control for managing the gingival manifestations of oral lichen planus: A randomized controlled study. **J Clin Periodontol**, v.40, n.9, p.859-867, 2013.
- TAO, X. et al. Assessment of local angiogenesis and vascular endothelial growth factor in the patients with atrophic-erosive and reticular oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.103, n.5, p.661-9, 2007.
- TILKI, D. et al. Emerging biology of vascular wall progenitor cells in death and disease. **Trends Mol Med**. v.15, p.501-9, 2009.
- THONGPRASOM, K.; PRAPINJUMRUNE, C.; CARROZZO, M. Novel therapies for oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, v.42, n.10, p.721-7, 2013.
- UCUZIAN, A.A. et al. Molecular mediator of angiogenesis. **J Burn Care Res**. v.31, p. 158-75, 2010.
- USATINE, R.P; TINITIGAN, M. Diagnosis and treatment of lichen planus. **Am Fam Physician**, v.84, n.1, p.53-60, 2011.
- VAN DER MEIJ, E.J.; SCHEPMAN, K.P.; VAN DER WAAL, I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.96, p.164-171, 2003.
- VASSILAKOPOULOU, M.; PSYRRI, A.; ARGIRIS, A. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. **Oral Oncol**, v.51, n.5, p.409-15, 2015.
- WANG, X. et al. Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. **Apoptosis**, v.9, p.131-43, 2004.

WISE LM, et al. The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration. **Cell Microbiol**, v.14, n.9, p.1376-90, 2012.

WOOLARD, J. et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. **Cancer Res**, v.64, n.21, p.7822-35, 2004.

YAN, L.; WANG, J.M.; ZENG, K. Association between HLA-DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta-analysis. **Br J Dermatol**, v.167, n.4, p.768-77, 2012.

ZAMPETAKI, A.; KIRTON, J.P.; XU, Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. **Cardiovasc Res**. v.78, p.413-21, 2008.

ZHOU, S. et al. Thalidomide – a notorious sedative to a wonder anticancer drug. **Curr Med Chem**, v.20, n.33, p.4102-8, 2013.

APÊNDICES

Os dados clínicos, a média de marcação dos anticorpos VEGF165 e VEGF165b por zona, a média de marcação total dos anticorpos VEGF165 e do VEGF165b, e a intensidade de marcação dos anticorpos VEGF165 e do VEGF165b nos casos de LPO Reticular, LPO Erosivo, Pênfigo Vulgar e Hiperplasia Fibrosa (sem dados clínicos) foram obtidos e consequentemente digitados em planilha eletrônica no programa Excel (*Microsoft Office 2016® for Windows*).

[illegible]

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE HIF-1 α COM A ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO VEGF165 E DO VEGF165b EM LESÕES DE LÍQUEN PLANO ORAL E PÊNFIGO VULGAR

Pesquisador: ANTONIO DE LISBOA LOPES COSTA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 69860517.7.0000.5537

Instituição Proponente: Pós-Graduação em Patologia Oral

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.155.965

Apresentação do Projeto:

O protocolo de pesquisa analisado é intitulado “Relação entre os polimorfismos do gene HIF-1 com a análise da expressão imuno-histoquímica do VEGF-165 e do VEGF-165b em lesões de líquen plano oral e pênfigo vulgar”. Trata-se de uma pesquisa objeto de um doutoramento no programa de pós-graduação em Odontologia da UFRN.

O estudo tem como objeto o Líquen Plano Oral (LPO) e o Pênfigo Vulgar (PV) e a expressão imuno-histoquímica de VEGF-165 e VEGF-165b. As patologias aqui estudadas são doenças imunológicas crônicas mucocutâneas de etiologias desconhecidas que podem acometer a mucosa oral. A angiogênese exerce um importante papel no crescimento e na progressão tumoral e, entre todos os tipos de VEGFs, o VEGF-A é a proteína angiogênica mais potente tanto na angiogênese normal quanto na patológica. O produto do gene HIF-1 tem um papel central em uma grande quantidade de processos biológicos (angiogênese e carcinogênese), alguns dos quais ocorrem em condições de hipóxia. Por isso o interesse em associar polimorfismos nesse gene e a expressão de VEGF nas doenças escolhidas no projeto. Deste modo, avalia-se o papel do gene HIF-1 como fator de risco para LPO e PV.

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

CEP: 59.078-970

E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br

Continuação do Parecer: 2.155.965

Serão analisadas 98 amostras de material de arquivo (espécimes preservados em formol) obtidas no setor de arquivo da disciplina de patologia oral da UFRN. Após a preparação das lâminas serão aplicadas técnicas de imuno-histoquímica para a detecção e quantificação de VEGF-165 e VEGF-165b. DNA será extraído de amostras previamente armazenadas e a genotipagem via PCR-RFLP. Serão realizados testes de Fisher para a determinação das associações genéticas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar se o polimorfismo no gene HIF-1 (C1772T e G1790A) está associado ao risco de desenvolvimento do LPO e do PV, bem como avaliar a sua relação com a expressão imunoistoquímica do VEGF165 (angiogênico), do VEGF165b (antiangiogênico) em uma série de casos dessas lesões, na tentativa de melhor compreender a patogênese, progressão, além da autoperpetuação dessas doenças autoimunes crônicas inflamatórias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos já que se trata de um estudo com material de arquivo e as amostras não serão identificadas.

Não há benefícios diretos para os participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa básica, analítica transversal usando material de arquivo.

Serão incluídas amostras compostas por lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE), com diagnóstico histopatológico de líquen plano oral reticular e erosivo e, pênfigo vulgar, casos cujos blocos em parafina apresentem quantidade suficiente de material para realização dos estudos imunoistoquímico e para a extração de DNA genômico; Casos cujas fichas apresentarem todos os dados necessários para a realização do estudo clínico. As lesões de LPO serão consideradas reticulares quando estiverem descritas nas fichas clínicas dos pacientes como: assintomáticas, com linhas brancas entrelaçadas ou como pápulas; e as erosivas como: lesões eritematosas, ulceradas e sintomáticas (apresentando dor e/ou ardor), conforme Neville et al., (2009) e Carozzo e Thorpe (2009); DNA genômico previamente extraído com concentração e pureza suficientes para a análise

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

CEP: 59.078-970

E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br

Continuação do Parecer: 2.155.965

dos polimorfismos.

Serão excluídas amostras que não satisfizerem os critérios de exclusão.

O orçamento e o cronograma estão adequados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes termos:

- a) Carta de apresentação da pesquisa ao CEP;
- b) Folha de rosto adequadamente preenchida;
- c) Declaração de não-início;
- d) Formulário da Plataforma Brasil devidamente preenchido;
- e) Termo de confidencialidade assinado pelo orientador e pela doutoranda;
- f) Carta de anuência assinada pela chefe do Departamento de Odontologia;
- g) Formulário da Plataforma Brasil;
- i) Termo de concessão assinado pela responsável pelo setor de arquivos da disciplina de Patologia Oral da UFRN;
- j) Projeto de pesquisa completo;
- k) Justificativa para a dispensa do TCLE argumentando que o material utilizado será de arquivo e bastante antigo, e que também a pesquisa não apresenta risco direto para os participantes.

Recomendações:

OBS.: É obrigatório o envio dos relatórios parcial (durante o curso) e final da pesquisa (ao seu término).

OBS2.: Cumpre ressaltar que os dados do prontuário são de propriedade única e exclusiva do próprio sujeito, que forneceu tais informações em uma relação de confidencialidade entre médico e paciente, para realização do seu tratamento e cuidado médicos, e não para utilização de tais dados em pesquisas. Dessa forma, no que se refere ao uso e acesso aos prontuários, a CONEP alerta no sentido de obediência às disposições éticas e legais brasileiras: Constituição Federal Brasileira (1988) – art.5º, incisos X e XIV; Novo Código Civil – artigos 20 e 21; Código Penal – artigos 153 e 154; Código de Processo Civil – artigos 347, 363, 406; Código de Defesa do

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

CEP: 59.078-970

E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br

Continuação do Parecer: 2.155.965

Consumidor – artigos 43 e 44; Código de Ética Médica – CFM. Artigos. 11, 70, 102, 103, 105, 106, 108; Medida Provisória – 2.200 – 2, de 24 agosto de 2001; Normas da Instituição quanto ao acesso prontuário. Parecer CFM nº 08/2005; Parecer CFM nº 06/2010;

Padrões de creditações hospitalares do Consórcio Brasileiro de Acreditação, em particular GI.2 – GI 1.12; Resoluções da ANS. (Lei nº 9.961 de 28/01/2000) em particular a RN nº 21; Resoluções do CFM. – nº. 1605/2000 – 1638/2002 – 1639/2002 – 1642/2002. 4. Reafirmamos que as pesquisas que envolvam acesso e uso de prontuário médico/odontológico devem ser analisadas pelo Sistema CEP/CONEP, contudo não cabe a tal sistema legislar sobre o acesso e uso do prontuário médico. Porém, cabe determinar o cumprimento do sigilo e da confidencialidade, além de exigir que toda pesquisa envolvendo seres humanos trate os mesmos em sua dignidade, respeite-os em sua autonomia e defenda-os em sua vulnerabilidade.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A análise do protocolo de pesquisa indica que todos os documentos necessários para o processo ético estão apresentados de maneira adequada. A justificativa para pedido de dispensa de TCLE é aceitável, porém devem ser observadas as questões e normativas que regulam uso de prontuários médicos constantes nas recomendações desse parecer. Diante do exposto, o protocolo de pesquisa está aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde - CNS e Manual Operacional para Comitês de Ética - CONEP é da responsabilidade do pesquisador responsável:

1. elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinatura estar na mesma folha (Res. 466/12 - CNS, item IV.5d);
2. desenvolver o projeto conforme o delineado (Res. 466/12 - CNS, item XI.2c);
3. apresentar ao CEP eventuais emendas ou extensões com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética - CONEP, Brasília - 2007, p. 41);
4. descontinuar o estudo somente após análise e manifestação, por parte do Sistema CEP/CONEP/CNS/MS que o aprovou, das razões dessa descontinuidade, a não ser em casos de justificada urgência em benefício de seus participantes (Res. 446/12 - CNS, item III.2u) ;
5. elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais (Res. 446/12 - CNS, item XI.2d);

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

CEP: 59.078-970

E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br

**UFRN - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE - LAGOA NOVA**



Continuação do Parecer: 2.155.965

6. manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa (Res. 446/12 - CNS, item XI.2f);
7. encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto (Res. 446/12 - CNS, item XI.2g) e,
8. justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou não publicação dos resultados (Res. 446/12 - CNS, item XI.2h).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_922771.pdf	14/06/2017 10:27:05		Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaonaoinicicionova.pdf	14/06/2017 10:26:28	ANTONIO DE LISBOA LOPES COSTA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TermodeConcessao.pdf	23/05/2017 19:05:57	ANTONIO DE LISBOA LOPES COSTA	Aceito
Outros	CEP.pdf	23/05/2017 18:58:30	ANTONIO DE LISBOA LOPES COSTA	Aceito
Outros	Formulario2.pdf	23/05/2017 18:57:17	ANTONIO DE LISBOA LOPES COSTA	Aceito
Outros	Formulario1.pdf	23/05/2017 18:56:50	ANTONIO DE LISBOA LOPES COSTA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Confidenciabilidade.pdf	23/05/2017 18:54:36	ANTONIO DE LISBOA LOPES COSTA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoDepartamento.pdf	23/05/2017 18:52:57	ANTONIO DE LISBOA LOPES COSTA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaTCLE.pdf	23/05/2017 18:49:07	ANTONIO DE LISBOA LOPES COSTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	ProjetodepesquisaDoutorado.doc	23/05/2017 18:48:18	ANTONIO DE LISBOA LOPES	Aceito

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

CEP: 59.078-970

E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br

UFRN - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE - LAGOA NOVA



Continuação do Parecer: 2.155.965

Investigador	Projeto de pesquisa Doutorado.doc	23/05/2017 18:48:18	COSTA	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	23/05/2017 18:45:38	ANTONIO DE LISBOA LOPES COSTA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

NATAL, 04 de Julho de 2017

Assinado por:
LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ
(Coordenador)

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

CEP: 59.078-970

E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br